FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1969 1970

N° 29

THESE
pour le
DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Université

par

Joël MENARD
Né le 4 Septembre 1940 à NANTES (Loire-Atlantique)

Présentée et soutenue publiquement le ..1.9.7.0

APPLICATION D'UNE NOUVELLE MICRO-METHODE DE MESURE DE LA RENINE PLASMATIQUE ET DE L'ANGIOTENSINOGENE DU RAT A L'ETUDE DE DIVERSES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

Président : Monsieur le Professeur P. MILLIEZ

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1969 N°

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Université

par

Joël MENARD

Né le 4 Septembre 1940 à NANTES (Loire-Atlantique)

Présentée et soutenue publiquement le .....

APPLICATION D'UNE NOUVELLE MICRO-METHODE DE MESURE DE LA RENINE PLASMATIQUE ET DE L'ANGIOTENSINOGENE DU RAT A L'ETUDE DE DIVERSES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

Président : Monsieur le Professeur P. MILLIEZ

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents, ma femme et mon fils.

A tous mes Maîtres dans les hôpitaux.

Je n'oublie jamais en exerçant cette profession qu'ils m'ont fait aimer tout ce que j'ai appris d'eux, comme stagiaire, externe ou interne.

A mon Maître Paul MILLIEZ,
avec mon affectueuse admiration.

Au Docteur Jacques GENEST et au Docteur Roger BOUCHER qui m'ont accueilli et m'ont guidé dans la réalisation de ce travail.

1er/3/1968

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Bénard (H.), Bernard (E.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Cheymol (J.), Coste (F.), Debré (R.), Dechaume (M.), Galliard (H.), Gaudard d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Giroud (A.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lacomme (M.), Lamy (M.), Laroche (G.), Lelong (M.), Lévy (Mlle J.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Maduro (R.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Turpin (R.), Verne (J.).

DOYEN	Georges BROUET
1er ASSESSEUR	Daniel BARGETON
2e ASSESSEUR	Jean GOSSET

A. — CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
—	HUARD (P.)
à titre personnel	CABROL (Ch.)
— —	OLIVIER (G.)
Anatomie et Cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
à titre personnel	NEZELOF (Ch.)
— —	ORCEL (L.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
— —	DESGREZ (P.)
— —	POLONOVSKI (J.)
Chimie Pathologique	SCHAPIRA (G.)
à titre personnel	CARTIER (P.)
— —	DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale (à titre personnel)	BOURLIÈRE (F.)
— —	HARTMANN (L.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
— —	DJOURNO (A.)
— —	DOGNON (A.)
à titre personnel	KELLERSHOHN (L.)
— —	GOUGEROT (L.)
— —	ROUCAYROL (J.-Cl.)
Cancérologie expérimentale	MATHÉ (G.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histologie et Embryologie	COUJARD (R.)
— —	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
à titre personnel	RACADOT (J.)
Microbiologie	FASQUELLE (R.)
Bactériologie et Virologie	TOURNIER (P.)
à titre personnel	BARBIER (P.)
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
à titre personnel	LŒPER (J.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.-R.)
—	LECHAT (P.)

	MM.
Physiologie	BARGETON (D.)
—	MALMEJAC (J.)
—	PARROT (J.)
à titre personnel	DEJOURS (P.)
Physiologie et biologie appliquée aux sports	SCHERRER (J.)

B. — CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

1° MÉDECINE

Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Histoire de la Médecine et de la Chirurgie	COURY (Ch.)
Hygiène et Médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale, droit médical et deontologie	DEROBERT (L.)
Pathologie exotique	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie médicale	BUGE (A.)
— —	BRICAIRE (H.)
— —	CORNET (A.)
— —	HOUSSET (E.)
— —	LAROCHE (Cl.)
à titre personnel	AZERAD (E.)
— —	BOUR (H.)
— —	BROCARD (H.)
— —	CAROLI (J.)
— —	FACQUET (J.)
— —	LAMBLING (A.)
— —	LAUNAY (Cl.)
— —	PAYET (M.)
— —	PERRAULT (M.)
— —	LIQUIER (F.)
— —	WORMS (R.)
— —	BUVIER (J.)
Pathologie respiratoire	TUPIAF (J.)
Pathologie et Thérapeutique générales	MAURICE (P.)
Thérapeutique	LAMOTTE (M.)
Thérapeutique appliquée	MARCHE (J.)

Chaires de Cliniques :

Clinique cardiologique (Boucicaut)	LENÈGRE (J.)
— — (Broussais)	SOULIÉ (P.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)	DUPERRAT (F.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DE JOURT (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard	MOLLARET (P.)
a titre personnel	BASTIN (R.)
Clinique des maladies mentales et de l'encephale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
a titre personnel (neuro-psychiatrie)	PICHOT (P.)
Clinique des maladies du systeme nerveux (Salpetrière)	CASTAIGNE (P.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
a titre personnel	LHERMITTE (F.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpetrière)	MICHAUX (L.)

	MM.
Clinique des maladies du sang (Broussais)	BERNARD (J.)
à titre personnel (hématologie)	ANDRÉ (R.)
— —	BOUSSER (J.)
— —	DREYFUS (B.)
Cliniques médicales — Bicêtre.	DEPARIS (M.)
Cliniques médicales — Broussais	MILLIEZ (P.)
Cliniques médicales — Cochin	PEQUIGNOT (H.)
Cliniques médicales — Hôtel-Dieu	BARIETY (M.)
Cliniques médicales — Pitié	DREYFUS (G.)
Cliniques médicales — Saint-Antoine	BOUDIN (G.)
	CONTE (M.)
	KOURILSKY (R.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique et Séméiologie médicales (Antoine-Chantin).	DOMART (A.)
Séméiologie médicale (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y.)
— — (Pitié)	RAMBERT (P.)
— — (Rothschild)	WOLFROMM (R.)
Clinique d'Hydrologie et de Climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
à titre personnel	GIBERTON (A.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques (Hôtel-Dieu).	DEROT (M.)
Clinique néphrologique (Necker)	HAMBURGER (J.)
à titre personnel	RICHET (G.)
— —	CROSNIER (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	ROYER (P.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades).	MOZZICONACCI (P.)
Clinique médicale infantile et de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pédiatrie (Trousseau)	BRISSAUD (H.)
à titre personnel	LESOBRE (R.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S.)
Hygiène et Clinique de la première enfance (Trousseau)	LAPLANE (R.)
à titre personnel	POLONOVSKI (Cl.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BROUET (G.)
à titre personnel	KREIS (B.)
— —	MEYER (A.)
Clinique de rééducation motrice.	GROSSIORD (A.)
Electroradiologie	LEDOUX-LEBARD (M.)
—	LEFEBVRE (J.)
Radiologie médicale.	DESGREZ (H.)
à titre personnel	FISCHGOLD (H.)
— —	TUBIANA (M.)
— —	CHERIGIE (E.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin).	DELBARRE (F.)
Clinique rhumatologique (Lariboisière)	SÈZE (S. de)
Clinique toxicologique (Fernand-Widal)	GAULTIER (M.)

2e CHIRURGIE

Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
— —	KUSS (R.)
— —	N...
à titre personnel	RAMADIER (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	MORIN (P.)
Technique chirurgicale et chirurgie expérimentale	MONSAINGEON (A.)

Chaires de Cliniques :

Clinique carcinologique (Gustave-Roussy)		DENOIX (P.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
à titre personnel		BRÉHANT (J.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	—	BAUMANN (J.)
	Cochin	LÉGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)		ROUX (M.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)		POILLEUX (F.)
— — — (Saint-Louis)		DEBEYRE (J.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)		MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
— — — — (Foch)		PADOVANI (P.)
— — — — (Beaujon)		CAUCHOIX (J.)
Clinique traumatologique et orthopédique (Raymond-Poincaré)		JUDET (R.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)		FÈVRE (M.)
à titre personnel		CHIGOT (P.-L.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)		DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie thoracique (Laennec)		MATHEY (J.)
à titre personnel		GAUDART D'ALLAINES (Cl. de)
Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca)		HUGUIER (J.)
Clinique obstétricale (Baudelocque)		LEPAGE (F.)
— — (Saint-Antoine)		MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)		VARANGOT (J.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)		DAVID (M.)
à titre personnel		LEBEAU (J.)
Clinique ophtalmologique (Cochin)		BRÉGEAT (P.)
— — (Hôtel-Dieu)		OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Laribosière)		AUBRY (M.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)		CERNEA (P.)
Clinique urologique (Cochin)		ABOULKER (P.)
— — (Necker)		COUVELAIRE (R.)

C. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM.
Anatomie	GILLOT (Cl.)
Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Bactériologie	LE MINOR (L.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.) GONNARD (P.) NORDMANN (J.)
Chirurgie	CERBONNET (G.)
Hématologie	BESSIS (M.) BILSKI-PASQUIER (B.)
Hygiène	BLANCHER (G.) CORRE-HURST (Mme L.)
Médecine légale	CECCAL P.) HADENGUE (A.) FOURNIER (E.)
Médecine générale	AUSSANNAIRE (M.)
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Neuro-psychiatrie	TARDIEU (G.)
Pédiatrie	ROSSIER (A.)
Physique médicale	COURSAGET (J.) GREMY (F.) PELLERIN (P.)
Physiologie	DURAND (J.) GIRARD (Fr.) HUGELIN (A.)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A.)
Pharmacologie	SCHMITT (H.)

D. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

	MM.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

E. — PROFESSEURS ASSOCIÉS

Hormonologie	MORICARD (R.)
Statistique médicale et épidémiologie	SCHWARTZ (D.)
Néphrologie	MAXWELL (M.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseiller administratif	Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque. Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mme FORGET (F.), Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), LE QUANG LINH (G.), REUGE (M.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

RESUME

Les mesures de la concentration rénale de la rénine et de l'index de granularité des cellules juxta-glomérulaires effectuées chez le rat ont constitué un apport fondamental pour la compréhension du rôle physiologique et physiopathologique du système rénine-angiotensine. De nouveaux progrès pouvaient être attendus d'une méthode de mesure de l'Activité Rénine Plasmatique.

Le travail présenté dans cette thèse résulte de l'application d'une nouvelle micro-méthode* de mesure de la rénine et de l'angiotensinogène sur 0,1 millilitre de plasma de rat, à l'étude physiopathologique du système rénine-angiotensine chez le rat. Les valeurs normales de l'Activité Rénine Plasmatique du rat mâle ont été déterminées sous une diète standard avec et sans anesthésie.

Les points suivants ont pu alors être démontrés :

1°) Le régime sans sel prolongé entraîne une sécrétion de rénine d'importance très variable d'un animal à l'autre, et chez le même animal, d'un jour à l'autre. Il existe cependant une corrélation parfaite entre la moyenne des Activités Rénines Plasmatiques mesurées au cours de trois mois d'étude, et l'index de granularité de l'appareil juxta-glomérulaire mesuré en fin d'expérience.

2°) Le régime salé abaisse toujours l'Activité Rénine Plasmatique qui est supprimée si l'on administre en plus de la désoxycorticostérone.

* BOUCHER R, MENARD J et GENEST J.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 1966, 45, 881

.../...

3°) Les études faites sur l'hémorragie, la déplétion sodée aigue par dialyse péritonéale, la restriction hydrique de trois jours ont démontré :

- que les baisses de la volémie, surtout celles secondaires à une perte en sel, étaient l'un des facteurs les plus importants du déclenchement de la sécrétion de rénine, dont le mécanisme intime reste à élucider,
- qu'une valeur absolue d'Activité Rénine Plasmatique ne pouvait être interprétée que rapportée à la balance sodée.

4°) A partir de ces faits, la signification des mesures de la rénine plasmatique ou rénale effectuées chez l'homme et l'animal peut être réévaluée.

La sécrétion de rénine inappropriée à la volémie due au clampage de l'artère rénale aboutit à l'hypertension rénovasculaire. La sécrétion de rénine déclenchée par une anomalie de répartition de la masse sanguine aboutit à l'hypervolémie (grossesse, varices) ou à l'oedème (cirrhose, insuffisance cardiaque).

P L A N

INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTERATURE

I - INTRODUCTION 1

A) Place du système rénine-angiotensine dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle

B) Buts du travail expérimental

II - REVUE GENERALE DU SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE 2

A) Données biochimiques 3

B) Facteurs déclenchant la sécrétion de rénine 4

1°) Pression de perfusion rénale

2°) Composition de l'urine dans le tube distal

3°) Système nerveux sympathique

C) Rôles physiologiques de l'angiotensine 7

1°) Régulation de la pression artérielle

2°) Régulation de l'élimination rénale de l'eau et du sodium

a) Action directe à court terme

- Chez le rat
- Chez le chien
- Conclusions

b) Action indirecte à long terme

MICROMETHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE, DE L'ANGIOTENSINOGENE PLASMATIQUE, DU CONTENU EN RENINE DU REIN

A) Matériel, réactifs et appareillage utilisés 19

B) Préparation du substrat 20

C) Mesure de l'Activité Rénine Plasmatique 23

D) Mesure de la rénine rénale 25

E) Mesure de l'angiotensinogène plasmatique 26

F) Recouvrement et reproductibilité 26

G) Discussion 27

...

L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE DU RAT NORMAL

A) Matériel 29
B) Résultats chez le rat éveillé et anesthésié 29
C) Discussion 30

INFLUENCE DU CONTENU EN SODIUM DU REGIME SUR L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE DU RAT

A) Matériel et protocoles expérimentaux 32
B) Résultats 33
1°) Restriction sodée prolongée
2°) Restriction sodée associée à l'administration d'hydrochlorothiazide
3°) Surcharge en sodium
4°) Surcharge en sodium et désoxycorticostérone
C) Discussion 35

IMPORTANCE DES VARIATIONS DU VOLUME PLASMATIQUE SUR LE DECLENCHEMENT DE LA SECRETION DE RENINE

A) Protocoles expérimentaux 39
1°) Hémorragies
2°) Dialyses péritonéales
3°) Restriction hydrique
B) Résultats 41
C) Discussion 44

REINTERPRETATION DES DONNEES DE LA LITTERATURE CONCERNANT LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE DANS DIVERS ETATS PATHOLOGIQUES

A) Introduction 49
B) Rappel de certains résultats expérimentaux 50
C) Hypertensions artérielles expérimentales 52
D) Hypersécrétion de rénine sans hypertension artérielle 54

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTERATURE

-=-=-=-=-=-

I - INTRODUCTION

Les recherches concernant la physiopathologie de l'hypertension artérielle sont orientées par trois hypothèses principales de travail. L'élévation tensionnelle peut dépendre :

- d'une anomalie du métabolisme du sodium suggérée sur des arguments épidémiologiques (1,7) expérimentaux (2) et cliniques (3, 4).

- d'une élévation du débit cardiaque ou/et des résistances périphériques (5, 6) dépendant du système nerveux sympathique ou d'hormones pressives.

- d'un déficit en une éventuelle substance vaso-dépressive (7) ou antihypertensive (8, 9).

L'intérêt porté au système rénine-angiotensine découle des propriétés de l'angiotensine II :

- l'angiotensine II est le plus puissant vaso-constricteur connu, 5 à 10 fois plus puissant, molécule pour molécule, que la noradrénaline (10).

- l'angiotensine II concourt à la régulation du métabolisme du sodium par son action rénale directe, vasculaire et tubulaire (11) et par la stimulation de la sécrétion d'aldostérone qu'elle semble capable d'entraîner dans certaines espèces animales (12, 13, 14).

Nos connaissances actuelles sur le système rénine-angiotensine reposent pour une bonne part sur les nombreux résultats accumulés chez le rat, en particulier par le groupe de Gross (15). Les déterminations de la concentration rénale

.../...

de la rénine ne prêtent guère à discussion ; elles sont le plus souvent en accord avec les études histologiques de l'appareil juxta-glomérulaire (16) où semble synthétisée la rénine. Mais il n'a pas encore été possible d'apprécier les variations probablement rapides et fines de la rénine plasmatique du rat. Cette rénine circulante est une fraction minime de la rénine rénale, mais c'est par elle que s'exerce, au moins en partie, l'activité biologique du système rénine-angiotensine ; c'est donc elle qui doit être explorée. Les méthodes de circulation croisée (17, 18) en ont certainement permis une première approche. Sans sous-estimer leur valeur, on peut cependant faire des réserves et sur leur spécificité et sur leur sensibilité.

On conçoit ainsi l'intérêt d'une méthode de mesure de l'Activité Rénine Plasmatique du rat qui, sur une très faible quantité de plasma serait spécifique, sensible et reproductible.

Le travail présenté dans cette thèse a donc eu pour but :

- de développer une micro-méthode de mesure de l'Activité Rénine Plasmatique du rat répondant aux critères que nous avons énumérés.

- d'établir les bases de l'utilisation physiologique de cette méthode, en explorant le rat normal, dans différentes conditions d'équilibre hydrosodé.

- d'insister sur l'importance des baisses du volume plasmatique dans le déclenchement de la sécrétion de la rénine.

II - REVUE GENERALE DU SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE

L'intérêt croissant suscité par le système rénine-angiotensine est attesté par le nombre des communications le concernant : deux communications dans "Clinical Research" en

1964 et en 1965 et vingt en 1966 et par la fréquence des revues générales en six ans (19, 20, 21, 22, 23, 24).

A - DONNEES BIOCHIMIQUES

La rénine est un enzyme de poids moléculaire voisin de 42,000 (25,26). Par électrophorèse en gel d'amidon, elle migre avec les pré-albumines (27). Sa structure moléculaire est inconnue. Il est possible qu'il existe chez l'homme plusieurs formes de rénine (28).

Le substrat de la rénine est l'angiotensinogène plasmatique, globuline de poids moléculaire 57,000 élaboré par le foie.

L'hydrolyse de l'angiotensinogène au niveau d'une liaison leucy-leucine (29,30) libère un décapeptide : l'angiotensine I. Celle-ci est transformée en un octapeptide : l'angiotensine II par un enzyme de conversion présent dans le plasma et synthétisé par le foie, actif en présence d'ions Cl-. Il libère un dipeptide histidyl-leucine (31). L'angiotensine II porte l'activité biologique.

Récemment, ARAKAWA et COLL (32) ont obtenu à l'état pur, l'angiotensine humaine alpha-L-aspartyl-1-Isoleucyl 5-Angiotensine II.

Les peptidases plasmatiques et tissulaires qui inactivent l'angiotensine sont appelées angiotensinases, à tort d'ailleurs, puisqu'elles ne sont pas spécifiques (33). Dans le plasma, l'angiotensinase A est une aminopeptidase (34) active en présence d'ions Ca^{++} dont le pH optimum d'action est 7,5. L'angiotensine est également dégradée à un pH optimum de 5,5 par des endopeptidases, inhibées par le diisopropylfluorophosphate Le rein, les surrénales, le foie (35,36, 37, 38) ont une activité angiotensinasique particulièrement importante. La disparition rapide de l'angiotensine injectée par voie intra-artérielle

.../...

dépend de l'activité angiotensinasique du plasma et des tissus mais aussi d'une fixation sur les parois vasculaires, nécessitant la présence d'un radical COOH libre à l'extrêmité de la molécule d'angiotensine (39). La cinétique de ces réactions enzymatiques est encore mal connue (40, 41). De plus, il existe peut-être des activateurs ou des inhibiteurs de ces réactions tel que celui isolé par SMEBY et BUMPUS dans la médullaire du rein du chien (42).

Pour explorer correctement le système rénine-angiotensine en physiologie et en pathologie, il faudrait donc mesurer l'angiotensinogène plasmatique, la rénine, les angiotensines I et II, l'enzyme de conversion, les angiotensinases et vérifier l'absence d'activateurs ou d'inhibiteurs des réactions enzymatiques.

En fait, ni le substrat, ni les enzymes n'ont été isolés à l'état pur : aucun ne peut donc être dosé d'une façon absolue.

La méthode développée dans cette thèse est une mesure de la rénine plasmatique par la capacité qu'a le plasma de l'animal d'expérience de libérer de l'angiotensine, dans des conditions standardisées, à partir d'un excès d'angiotensinogène. Il n'est pas certain que les variations de l'angiotensinémie soient toujours parallèles aux variations de la rénine (43). Cette réserve doit être gardée en mémoire lorsque, à la lumière des propriétés de l'angiotensine II, on tente de donner une signification physiologique ou physio-pathologique aux variations de la rénine plasmatique observée.

B - FACTEURS DECLENCHANT LA SECRETION DE RENINE

L'appareil juxta-glomérulaire est idéalement placé pour percevoir des stimulus presseurs et chimiques à la fois

.../...

dans le sang artériel rénal et dans l'urine du tube distal.

1°) Pression de perfusion rénale

On a pensé que la libération de la rénine pouvait être due aux stimuli suivants : diminution de la pression différentielle (44), variations de la tension pariétale de l'artère glomérulaire afférente (45), différence entre la pression dans l'artériole afférente et celle du tissu interstitiel (46, 47, 48), ou du tube distal (49). On a également mis en cause la baisse de la pression partielle en oxygène (50) et la réduction du flux sanguin rénal (51) ; le concept regrettable d' "ischémie rénale" est né de ces dernières hypothèses.

Le travail de SKINNER et COLL (52,53) démontre le rôle fondamental de la pression de perfusion rénale : l'hypoxie, la baisse du flux sanguin rénal, la réduction de la pression différentielle sont à elles seules inefficaces ; la libération de la rénine est uniquement déclenchée par la baisse de la pression moyenne dans l'artère rénale ; cette libération est immédiate et proportionnelle à l'intensité de ce stimulus.

2°) Composition de l'urine dans le tube distal

L'aspect histologique particulier des cellules de la macula densa, le parallélisme entre leur teneur en glucose-6-phosphate-déshydrogénase et la concentration rénale de rénine (54, 55) suggère des rapports entre la composition de l'urine tubulaire distale et l'élaboration de la rénine, par l'intermédiaire de la macula densa. L'osmolarité (56) de l'urine tubulaire distale ou sa concentration en sodium pourraient être les stimuli en cause : une striction de l'artère rénale augmente l'activité rénine dans la veine rénale mais cette augmentation ne se produit pas ou disparaît si l'on induit une diurèse sodée avant ou immédiatement après la pose du clamp sur l'artère rénale

Cette diurèse sodée a deux conséquences : elle augmente la quantité de sodium dans l'urine tubulaire distale et elle élève la pression intratubulaire. La diminution de la libération de rénine paraît seulement due à l'augmentation de la quantité de sodium ; le clampage de l'uretère effectué immédiatement après celui de l'artère rénale ne modifie pas en effet l'élévation de la rénine (57).

Ainsi, pour VANDER (57) comme pour WHITE (58), l'augmentation de la quantité de sodium tubulaire distal diminuerait l'élaboration de la rénine.

Des résultats apparemment opposés ont été obtenus par BROWN et COLL chez le chien : la forte natriurèse provoquée par l'injection d'un diurétique mercuriel s'accompagne dans les deux heures d'une augmentation et non d'une baisse de la rénine (59) ; de même chez l'homme, l'injection intraveineuse de furosémide accroît la rénine plasmatique (60). Nous reviendrons enfin sur les expériences de THURAU pour qui l'augmentation de la concentration du sodium en face de la macula densa est le facteur essentiel qui déclenche la sécrétion de rénine.

La discordance entre les résultats n'est pas surprenante: il peut y avoir compétition entre des stimuli presseurs dans l'artère rénale et chimiques dans le tube ; leur importance relative ne peut encore être appréciée avec exactitude ce qui rend hasardeuse toute tentative de synthèse.

3°) Système nerveux sympathique

Le système nerveux sympathique peut modifier la sécrétion de la rénine. Des fibres nerveuses amyéliniques ont été constatées au contact des cellules épithélioïdes de l'appareil juxta-glomérulaire (61). La dénervation rénale chez le rat ré-

.../...

duit la concentration rénale de rénine (62).

L'excitation du plexus sympathique péri-artériel rénal élève l'activité rénine dans la veine rénale (63) ; la perfusion de noradrénaline dans l'artère rénale augmente également l'activité rénine (64) si la pression moyenne de l'artère rénale est maintenue à son niveau physiologique (65).

Le rôle du système sympathique ne paraît cependant pas indispensable : une striction de la veine cave inférieure intrathoracique augmente la production de rénine d'un rein greffé au cou comme celle d'un rein normal in situ (66).

Enfin chez le chien et chez l'homme, un mécanisme direct de freination de la sécrétion de rénine par l'angiotensine à doses subpressives a été rapporté (67,68). Son mécanisme est inconnu.

C - ROLES PHYSIOLOGIQUES DE L'ANGIOTENSINE

1°) Régulation de la pression artérielle

Quelques faits suggèrent que l'angiotensine a un rôle dans la régulation physiologique de la pression artérielle.

L'orthostatisme provoque régulièrement une augmentation de la rénine plasmatique (69). Cette augmentation est très rapide : 20 minutes après la mise en position debout, l'activité rénine moyenne triple (70).

L'augmentation de la rénine est due au seul changement de la position du corps et est indépendante de l'effort musculaire (qui peut à lui seul élever la rénine) (71).

L'orthostatisme s'accompagne de perturbations hémodynamiques rénales, diminution de la filtration glomérulaire et du flux sanguin rénal et de perturbations hémodynamiques générales, diminution du flux sanguin dans divers organes, comme le foie (72, 73).

Les relations unissant ces perturbations hémodynamiques et l'augmentation de la rénine peuvent être envisagées de deux façons :

a) L'orthostatisme réduit le volume plasmatique. L'hypovolémie diminuerait la pression moyenne de perfusion dans l'artère rénale et stimulerait le système rénine-angiotensine, cause des perturbations hémodynamiques rénales et générales.

b) L'orthostatisme excite le système sympathique et augmente les catécholamines. Il en résulte une tachycardie maintenant constant le débit cardiaque et une vaso-constriction artériolaire diffuse. La vaso-constriction artérielle rénale ou l'action directe des catécholamines serait la cause de l'augmentation de la rénine.

Quel que soit le mécanisme déclenchant la libération de rénine, l'hyperangiotensinémie peut avoir deux conséquences : augmentation des résistances périphériques en synergie avec les catécholamines et stimulation de la sécrétion d'aldostérone. L'hyperaldostéronisme de l'orthostatisme (74) contribue à corriger l'hypovolémie.

Les intéressantes constatations de SLATON et BIGLIERI (75) plaident également en faveur d'un rôle physiologique de l'angiotensine. La manoeuvre de Valsalva provoque chez le sujet normal comme chez l'hypertendu, une chute immédiate de la pression artérielle suivie, à l'arrêt de la manoeuvre, d'un bref accoup hypertensif. L'angiotensine paraît intervenir dans la production de cette hypertension artérielle secondaire : au cours de la manoeuvre de Valsalva, la pression moyenne dans l'artère rénale s'abaisse fortement (76) ; chez les sujets ayant un adénome sécrétant de la cortico-surrénale et ayant

.../...

de ce fait, une nette diminution de la rénine plasmatique, l'accoup hypertensif secondaire ne se produit pas. Après exérèse de l'adénome, les variations tensionnelles produites par l'épreuve de Valsalva deviennent identiques à celles d'un sujet normal. La normalisation des réponses tensionnelles coïncide avec le retour à la normale de l'Activité Rénine Plasmatique. La sécrétion de rénine déclenchée par la manoeuvre de Valsalva a d'ailleurs été directement mesurée dans la veine rénale par BARBOUR (77).

Chez un urémique binéphrectomisé, traité par dialyses répétées, MERRIL a été frappé par l'importance de la baisse de la tension artérielle en orthostatisme. Aucune activité rénine n'était décelable dans le plasma(78).

L'angiotensine apparaît ainsi impliquée dans la régulation des variations tensionnelles rapides. La certitude de son intervention n'est cependant pas acquise et demande à être confirmée.

Le rôle de l'angiotensine dans le maintien de la pression artérielle basale est encore plus hypothétique : l'injection d'anti-rénine de porc à un chien n'abaisse pas sa pression artérielle(79).

L'activité cardiovasculaire de l'angiotensine paraît enfin liée au système nerveux sympathique (80). Ses actions chronotropes et inotropes (81,82), son action vaso-constrictrice rénale (83) ne s'exercent que si les catécholamines sont correctement stockées puis correctement libérées des terminaisons nerveuses (84). L'angiotensine augmente la sécrétion de la médullo-surrénale (85) et potentialise l'activité pressive d'agents sympathomimétiques tels que la tyramine (86).

.../...

2°) Régulation de l'élimination rénale de l'eau et du sodium

a) Action directe à court terme.

L'angiotensine modifie l'élimination rénale du sodium et de l'eau. Les résultats dépendent en apparence de l'espèce étudiée : l'angiotensine semble natriurétique chez le rat (87), le poulet (88), le lapin (89,90) et le chat (91, 92) ; elle est antinatriurétique chez le chien et chez l'homme normal (93, 94, 95). En fait, dans toutes les espèces, l'action de l'angiotensine sur l'excrétion urinaire du sodium est très variable, influencée par l'anesthésie, la dose injectée, le bilan sodé antérieur à l'expérience (96, 97).

Chez le chien et chez l'homme, l'antinatriurèse semble refléter une action hémodynamique particulièrement puissante déprimant filtration glomérulaire et flux sanguin rénal.

Lorsque la réactivité vasculaire à l'angiotensine est moindre, comme chez l'homme normal déplété en sodium ou dans certains états pathologiques (98), la filtration glomérulaire varie peu et les effets tubulaires de l'angiotensine se démasquent : inhibition de la réabsorption tubulaire du sodium.

De nombreux travaux ont cherché à vérifier plus directement l'éventuelle action tubulaire de l'angiotensine.

In vitro, l'action tubulaire directe de l'angiotensine n'est pas prouvée : l'angiotensine ne modifie pas le transfert du sodium par la peau de crapaud (99). La quantité de Na 22 retenue par des tranches de cortex rénal de rat et de lapin est diminuée par l'angiotensine (100). Selon l'auteur néanmoins, les difficultés techniques de cette expérience (en particulier la présence d'angiotensinases rénales) ôtent à ces résultats une valeur formelle.

.../...

In vivo, l'action tubulaire de l'angiotensine est plus manifeste.

- Chez le rat

1. LEYSSAC mesure au microscope le temps d'occlusion des tubes proximaux après clampage total de l'artère rénale. Il pense ainsi mesurer la réabsorption tubulaire proximale du Na, puisque le flux urinaire ne se déplace ni vers le tube distal, ni vers le glomérule

L'injection intra-veineuse préalable d'angiotensine (0,1 ug/kg) allonge le temps d'occlusion (101,102); celle de noradrénaline est sans effet (103, 104).

LEYSSAC propose les conclusions suivantes :

- la réabsorption tubulaire proximale du Na est indépendante de la filtration glomérulaire puisqu'elle s'exerce alors que la filtration est interrompue ;
- l'angiotensine, allongeant le temps d'occlusion, diminue la réabsorption tubulaire proximale du sodium ;
- la réabsorption tubulaire proximale du sodium est bien sûr un processus actif, mais caractérisé par un "t" maximum ;
- l'angiotensine abaisse ce "t" maximum ;
- cette interprétation s'oppose à la conception classique de H. Smith selon laquelle la fraction de sodium réabsorbée reste constante, quelle que soit la quantité filtrée.

Cette interprétation s'oppose également aux résultats des microponctions faites chez le rat démontrant la constance de la fraction de réabsorption du sodium (105), sauf cependant aux valeurs extrêmes de la filtration glomérulaire (106, 107).

.../...

2. GERTZ, après micro-injection de l'angiotensine dans la lumière du tube proximal, observe également une réduction de 30% de la réabsorption sodée (108). L'interprétation de cette expérience doit tenir compte de l'importance de la dose d'angiotensine utilisée (10 mg/100 ml) et de l'application de l'angiotensine sur le pôle luminal de la cellule tubulaire, conditions peu physiologiques.

Ces résultats n'ont pas été retrouvés par d'autres auteurs (115).

- Chez le chien

Par une technique de stop-flow, VANDER constate que l'injection d'angiotensine (0,05 µg/kg/min) dans l'artère rénale d'un chien anesthésié augmente la concentration de sodium dans l'urine distale du rein d'expérience. La noradrénaline est sans action. L'angiotensine inhibierait dont la réabsorption distale du sodium (109), ce qui a été confirmé par WILKINS et coll. (110) Mais les doses d'angiotensine utilisées sont encore là très fortes.

Ces divers arguments expérimentaux attribuent à l'angiotensine une action tubulaire directe d'inhibition de la réabsorption tubulaire du sodium.

Plusieurs raisons empêchent encore néanmoins d'affirmer la réalité de cette action.

- le segment du tube rénal éventuellement influencé par l'angiotensine ne peut être défini : selon les expériences de LEYSSAC faites chez le rat, il s'agirait du tube proximal (104) selon VANDER, utilisant une technique de diurèse interrompue chez le chien, il s'agirait du tube distal (109) ; selon VILLA-REAL, mesurant les clearances rénales, l'action porte sur le tube

.../...

proximal (111).

- Dans les expériences mesurant les clearances rénales pendant une perfusion natriurétique d'angiotensine, même dans les plus précises (111), l'intervention de facteurs hémodynamiques ne peut être éliminée.

- Conclusions

La sécrétion du système rénine-angiotensine semble dépendre de la pression artérielle moyenne dans l'artère glomérulaire afférente d'une part et éventuellement de la teneur en sodium dans l'urine tubulaire, d'autre part.

L'angiotensine libérée produit une vaso-constriction des artères glomérulaires et modifie peut-être la réabsorption tubulaire du sodium. Ces données posent un problème physiologique essentiel ; l'angiotensine peut-elle être considérée comme une "hormone du rein" (112), assurant l'autorégulation de la circulation intra-rénale par ses effets vasculaires et réglant la pression intra-tubulaire par son action sur l'excrétion urinaire du sodium ?

REGULATION DE LA BALANCE GLOMERULO-TUBULAIRE

On peut, avec LEYSSAC (113) émettre l'hypothèse suivante : une réduction de la pression de filtration (provoquée par exemple par une striction de l'artère rénale) diminuerait la quantité de sodium au niveau de la macula densa. Une libération de rénine en résulterait. L'angiotensine rétablirait la pression intratubulaire par son action vasculaire et tubuliare : vaso-constriction de l'artériole glomérulaire efférente et inhibition de la réabsorption tubulaire proximale du sodium. L'augmentation de la rénine par réduction de la pression de perfusion (SKINNER) et sa diminution par l'accroissement du sodium tubulaire distal (VANDER), s'accordent avec cette hypothèse. Il existe des faits

.../...

contradictoires :

- les salidiurétiques augmentent la quantité de sodium au niveau de la macula densa déprimant instantanément la filtration glomérulaire (114) ;

- l'augmentation de la concentration en sodium, au niveau de la macula densa obtenue par micro-injections, réduit immédiatement le diamètre du tube proximal. Pour THURAU et coll. (115) cette réduction traduit une diminution de la filtration glomérulaire ; l'élévation de la concentration sodée dans la macula densa réduirait la filtration glomérulaire par le biais d'une libération d'angiotensine, puisque le phénomène n'est observé que sur des reins riches en rénine.

La divergence de ces résultats ne permet pas encore de proposer une séquence logique et certaine. L'angiotensine est peut-être le médiateur chimique de l'équilibre glomérulo-tubulaire, mais les modalités de son intervention encore imprécises doivent faire l'objet de recherches complémentaires à l'échelon du néphron.

AUTOREGULATION DE LA CIRCULATION INTRA-RENALE

Pour THURAU (116) une série de faits indirects suggère que l'angiotensine est impliquée dans l'autorégulation du flux sanguin rénal :

- l'autorégulation rénale est considérablement diminuée parfois abolie chez des animaux soumis à un régime riche en sodium et chez lesquels, de ce fait, le contenu rénal en rénine est diminué.

- l'autorégulation ne concerne que le flux sanguin cortical. Le flux sanguin médullaire n'est pas autorégulé. Or, le contenu en rénine des appareils juxta-glomérulaires diminue régulièrement de la corticale à la médullaire.

.../...

- l'autorégulation du flux sanguin rénal disparaît en 5 à 10 minutes après perfusion d'un soluté. L'addition de plasma au liquide de perfusion restaure l'autorégulation. Un facteur plasmatique est donc nécessaire pour que l'autorégulation apparaisse : ce pourrait être le substrat de la rénine.

Les variations de la consommation rénale d'oxygène ne sont pas dues à des modifications du taux d'extraction ; elles dépendent du flux sanguin rénal. La consommation rénale d'oxygène étant par ailleurs proportionnelle à la réabsorption tubulaire du sodium (117), il semble exister une relation entre réabsorption tubulaire du sodium et flux sanguin rénal ; cette relation pourrait dépendre de l'angiotensine.

Pour que le flux sanguin reste constant, les variations de la pression de perfusion et celles des résistances intra-rénales doivent être parallèles. L'angiotensine augmentant les résistances intra-rénales, on doit admettre les séquences suivantes :

1. Une baisse de la pression de perfusion rénale s'accompagnant d'une vaso-dilatation corticale doit freiner la libération d'angiotensine.

2. Inversement, une augmentation de la pression de perfusion s'accompagnant d'une vaso-constriction corticale doit augmenter la production d'angiotensine.

Ces propositions sont en désaccord complet avec la plupart des résultats expérimentaux (116).

Le rôle du système rénine-angiotensine dans l'autorégulation de la circulation rénale demeure donc encore très hypothétique.

.../...

b) Action indirecte à long terme.

L'angiotensine, indépendamment de son action rénale directe, stimule la production d'aldostérone et positive le bilan sodé.

IN VITRO

La production d'aldostérone par des tranches de surrénales de boeuf (118) ou de rat (119) augmente après incubation en présence d'angiotensine.

IN VIVO

1. Les perfusions d'angiotensine II chez le mouton (12) et chez le chien (120, 13) stimulent la sécrétion d'aldostérone, de cortisone et pour certains de cortisol (121). Cette action est plus discutée chez le rat (122, 123). Ceci souligne encore l'intérêt de la mesure de l'activité rénine plasmatique du rat. Si ces variations sont analogues à celles déjà observées dans d'autres espèces, c'est là un argument indirect en faveur de la similitude des relations angiotensine-aldostérone dans cette espèce.

2. L'injection d'antirénine à des chiens soumis à un régime sans sodium s'oppose à l'hypersécrétion d'aldostérone (124).

3. Chez l'homme, l'angiotensine II accroît l'excrétion (14) et la sécrétion d'aldostérone (125).

L'effet vasculaire de l'angiotensine n'est pas en cause, l'hormone agissant à des doses subpressives ; les catécholamines ne stimulent pas la sécrétion d'aldostérone (14).

Une perfusion de 24 heures d'angiotensine II augmente avec l'aldostéronurie, le sodium échangeable, l'espace extracellulaire et l'eau totale ; l'excrétion urinaire des 17 OH corti-

.../...

costéroïdes est inchangée (126).

Une perfusion prolongée positive le bilan sodé jusqu'au cinquième jour ; il se produit alors un phénomène "d'échappement" analogue à celui observé directement avec l'aldostérone (127). La stimulation de la cortico-surrénale par l'angiotensine n'est pas une action pharmacologique, mais physiologique : chez le sujet normal, les variations de la rénine plasmatique et de l'aldostéronurie sont parallèles : élévation par un régime sans sel (128, 129, 130) et au cours de la grossesse normale (131) ; effondrement lors d'une surcharge en sodium (128).

L'angiotensine II n'est cependant pas le seul facteur modulant la sécrétion d'aldostérone.

L'élévation de la kaliémie est un stimulus direct de la production d'aldostérone in vitro (132) et in vivo chez l'animal (133) et l'homme (134).

Le sodium pourrait agir directement sur la cortico-surrénale : un régime sans sodium augmenterait la sécrétion d'aldostérone même en l'absence de rein (135, 136) ; un bilan sodé positif diminue la réponse de la cortico-surrénale à la perfusion d'angiotensine

L'ACTH in vitro (137) et in vivo (138) accroît également la production d'aldostérone.

L'importance de l'angiotensine par rapport à ces stimuli demande à être précisée ; une perfusion simultanée d'ACTH et d'angiotensine n'augmente pas plus la sécrétion d'aldostérone que ne le fait isolément la perfusion de la même dose d'angiotensine (139). Une synergie entre ACTH et angiotensine est néanmoins suggérée par les faits suivants :

- chez un animal intact, l'excrétion d'aldostérone

.../...

causée par l'angiotensine est plus grande que chez un animal hypophysectomisé (140) ;

- l'élévation de la rénine plasmatique par le régime sans sodium est identique chez un chien normal et chez un chien hypophysectomisé ; l'excrétion d'aldostérone provoquée dans ces conditions est néanmoins trois fois plus faible chez l'hypophysectomisé (140).

MICROMETHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE, DE L'ANGIOTENSINOGENE PLASMATIQUE, DU CONTENU EN RENINE DU REIN

-=-=-=-=-=-=-=-

Ces méthodes dérivent de la macro-méthode de mesure de l'Activité Rénine Plasmatique proposée chez l'homme par BOUCHER, VEYRAT, DE CHAMPLAIN et GENEST, et largement utilisée depuis dans le monde.

A - MATERIEL, REACTIFS ET APPAREILLAGE UTILISES

Résine Dowex 50 WX2, 100-200 mèches : Baker's Analysed Reagent.

La résine est d'abord mélangée par agitation dans l'eau distillée, puis laissée au repos. Après décantation de la suspension de très fines particules qui en résulte, le procédé est répété deux à trois fois, jusqu'à ce que la résine sédimente rapidement, surmontée d'une couche aqueuse claire. Avant usage, 500 grammes de résine sont lavés avec 2 litres de NaOH 4N. Le sel de sodium de la résine est ensuite lavé avec 1 litre d'eau, 1 litre de HCl 2N et encore 2 litres d'eau. Enfin, la résine est lavée avec de l'acétate d'ammonium 0.2N à pH 6, jusqu'à ce que le pH de l'éluat atteigne 6.

Angiotensine : Valine-5-angiotensine II aspartique amide (Ciba). Une solution de 0,5 µg/ml dans le sérum salé (0,9%) et la bacitracine (0,05%) est préparée et le pH est ajusté à 7,5 avec du CO3 Na2. La solution standard est gardée

.../...

à 4° C., et préparée tous les 15 jours.

Sources de rénine : la rénine employée dans les expériences a été obtenue à partir de broyats de rein, dissous dans du NaCl 9‰. La rénine de porc lyophilisée a également été utilisée (N.B.C.).

Sel d'ammonium de l'EDTA à 15% : il est préparé par addition de NH4 OH concentré à l'EDTA, jusqu'à ce que celui-ci soit complètement dissout. Puis, du NH4 OH 1N est ajouté jusqu'à ce que le pH de 6,5 soit obtenu. Le volume est ensuite complété par de l'eau distillée.

Silicone : (S.C. 87 Dry-Film GB) 10% dans le CCl4

Tubes disposables de polystyrène : 16 x 150 mm -2040

Rotary-Evapo-Mix : Buchler Instrument.

Lyophilisateur : Modèle FDC-2. Thermovac Industries Co

Micro-seringues : Starrett Co. California Lab. Equipment.

B - PREPARATION DU SUBSTRAT

Le sang obtenu à partir de rats bien hydratés, néphrectomisés 24 heures auparavant et saignés par l'aorte est recueilli sur EDTA 15% ou héparine (200 unités/ml). Il est recueilli dans des tubes entourés de glace et centrifugé à 0-5° C, à 10.000 tours par minute, pendant 10 minutes. La méthode de préparation du substrat utilisée est semblable à celle de Haas (141). A 500 ml de plasma, obtenu à partir de 100 rats néphrectomisés, 9,4 grammes d'EDTA solide sont ajoutés. La solution est ajustée à pH 8 en ajoutant goutte à goutte de la soude NaOH 5N et agitée lentement à la température de la pièce pendant une heure. La solution est ensuite refroidie à 0-5° C et ajustée à pH 5,3 par addition lente d'acide sulfu-

.../...

rique 2,5N. Le substrat est précipité par addition de sulfate d'ammonium solide (2.3 M) et agité ensuite pendant 12 heures. Après centrifugation le précipité est suspendu dans 60 ml d'eau distillée et centrifugé. Le surnageant est dialysé contre de l'eau froide pendant 24 heures. Le précipité formé est retiré par filtration, la solution est ensuite lyophilisée. Cent rats donnent environ 14 grammes de substrat.

Le substrat est stable, et quand on l'incube seul à 37° C. pendant 12, 24 et 48 heures, il ne libère aucune substance pressive. Des excès de substrats venant de différentes préparations et incubés avec la même quantité de rénine libèrent la même quantité d'angiotensine.

Pour préparer le substrat nécessaire à 10 mesures de l'A.R.P., 1,5 g de la poudre lyophilisée est dissout dans 29 millilitres d'eau distillée. A la solution sont ajoutés 0,4 ml de NaN_3 1% et 0,4 ml de sel d'ammonium, de l'EDTA à 15%. Le pH est amené à 6,5 par addition de 0,05 ml de HCl 1N puis de NaOH 1N. Le mélange est gardé en chambre froide pendant 12 à 24 heures. Il est ensuite filtré sous pression à travers un filtre millipore (0,65u) et le pH est réajusté à 6,5.

A 3 millilitres de cette préparation est ajouté 1 millilitre de résine Dowex 50 W-X2 (NH_4^+) humide. Dans ces conditions on dispose d'un excès de substrat.

Les conditions optimales de la réaction enzymatique ont été étudiées, entre autres, l'effet du pH, de la concentration du substrat, du temps, de la concentration de la rénine, de la dilution dans l'eau et le sérum saléisotonique et de l'addition de NaCl et d'héparine.

.../...

1°) Effet du pH sur l'Activité Rénine Plasmatique

Avec le plasma normal, une quantité maximum d'angiotensine est obtenue à un pH 6,5. La même courbe est donnée par la rénine rénale, pour une formation d'angiotensine beaucoup plus importante (fig 1).

2°) Effet de la concentration du substrat sur la vélocité de la réaction enzymatique

La figure 2 illustre l'effet de quantités croissantes de substrat sur la formation de l'angiotensine, pour trois concentrations différentes de rénine de rat. Pour une quantité de rénine relativement grande (A), un plateau a été obtenu avec 150 milligrammes de substrat dans 3 millilitres de la solution préparée pour une incubation de 12 heures à 37° C. Pour cette concentration de substrat, la vitesse de formation de l'angiotensine reste constante jusqu'à 800 mµg, en 12 heures, à 37° C. Ces conditions fournissent un excès de substrat pour les activités rénine habituellement mesurables dans le plasma de rats.

3°) Effets de la durée de l'incubation sur la formation d'angiotensine

Pour des quantités de rénine relativement élevées, et jusqu'à 24 heures, la formation d'angiotensine lors de la réaction rénine-substrat est directement proportionnelle à la durée de l'incubation (fig 3). Une incubation de 12 heures a alors été choisie pour mesurer l'Activité Rénine Plasmatique. Avec une telle durée d'incubation, il y a suffisamment d'angiotensine formée pour permettre une mesure précise et la quantité de substrat nécessaire pour avoir une réaction enzymatique d'ordre zéro est modérée. Pour de très basses valeurs d'Activité Rénine Plasmatique, la durée d'incubation peut être prolongée jusqu'à 24 heures.

.../...

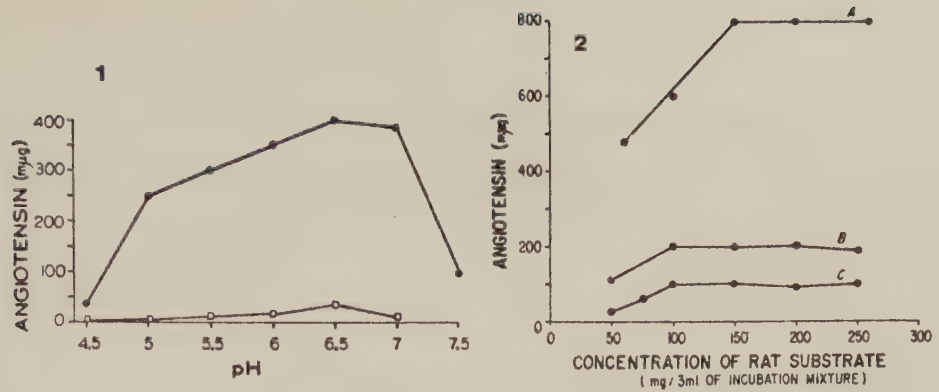

FIG. 1. Effect of pH on angiotensin formation. Rat substrate (150 mg/3 ml of incubatiou mixture) was incubated at 37 °C for 12 hours, with rat renin (215 μg of rat kidney tissue, ●) and with 0.1 ml of normal rat plasma (□).

FIG. 2. Influence of substrate concentration on angiotensin formation. Plots A, B, and C show the effect of progressively increasing the concentration of rat substrate in three experiments in which incubation was carried out at 37 °C for 12 hours at pH 6.5. (A) 500 μg rat kidney extract; (B) 125 μg rat kidney extract; (C) 0.1 ml of plasma rich in renin obtained from a severely oled rat.

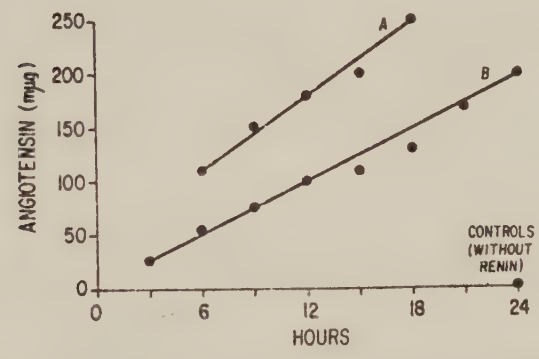

FIG. 3. Effect of time of incubation on angiotensin formation at 37 °C, for 12 hours, at pH 6.5, with 80 μg (A) and 50 μg (B) of kidney tissue extract.

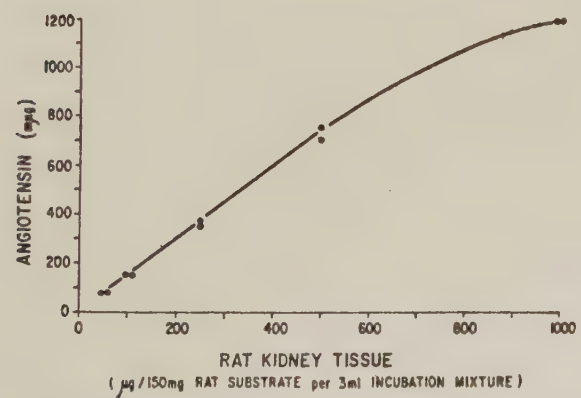

FIG. 4. Influence of increasing amounts of renin on liberation of angiotensin at pH 6.5 and 37 °C for 12 hours (duplicate experiments).

4°) Effet de la concentration de la rénine de rat sur la formation d'angiotensine

Une relation linéaire entre l'angiotensine libérée et la concentration de la rénine de rat est obtenue sur une large échelle de concentrations de rénine (fig. 4).

5°) Effet de la dilution dans l'eau et le sérum salé isotonique sur la formation d'angiotensine. Effets du NaCl et de l'héparine

La même quantité de rénine a été ajoutée à des quantités identiques de la même préparation de substrat diluée avec de l'eau, avec du sérum salé isotonique, ou additionnée de NaCl ou d'héparine (Tableau 1). Les résultats obtenus démontrent clairement que, tandis qu'une dilution de 3 fois dans l'eau diminue d'une façon importante la quantité d'angiotensine formée, les autres variables n'affectent pas la réaction enzymatique. Les mêmes résultats ont été obtenus dans quatre expériences identiques.

C - MESURE DE L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE

1°) Méthode

0,3 millilitre de sang veineux est prélevé dans la veine jugulaire du rat dans une seringue disposable de un millilitre contenant 0,005 ml d'une solution à 15% d'EDTA (sel d'ammonium) comme anticoagulant. Le piston est enlevé et le sang est centrifugé directement dans la seringue à 5° C, à 10.000 tours par minute pendant 10 minutes.

Après centrifugation, 0,1 millilitre de plasma est ajouté à 3 millilitres (150 mg) de la solution de substrat. Le plasma peut être conservé congelé, si le dosage ne peut être

.../...

EFFECT OF WATER AND ISOTONIC SALINE DILUTION, NaCl, AND HEPARIN ON THE FORMATION OF ANGIOTENSIN *

-=-=-=-=-=-

Experiment	Dilution with : (ml)		NaCl added (mg)	Heparin added (units)	Angiotensin found (m g)
	H_2O	NaCl 0,9 %			
1 (control)	0	0	0	0	160
2	3	0	0	0	160
3	6	0	0	0	150
4	9	0	0	0	75
5	0	3	0	0	160
6	0	6	0	0	140
7	0	9	0	0	150
8	0	0	10	0	150
9	0	0	20	0	130
10	0	0	30	0	135
11	0	0	0	150	160
12	0	0	0	300	170

* 0,1 mg rat kidney tissue plus 150 mg (3 ml) rat substrate, incubated at 37° C for 12 h at pH 6,5.

TABLE I

pratiqué immédiatement.

L'incubation débute à la fin de l'après-midi. Elle dure douze heures à 37° C avec une agitation vigoureuse. La réaction enzymatique est stoppée par refroidissement rapide à 0-5° C. Celui-ci est assuré par un système automatique qui arrête l'agitation et le chauffage à 37° C. du bain d'incubation au bout de 12 heures et déclenche une circulation d'eau froide jusqu'au lendemain matin.

L'incubation refroidie est ensuite transférée dans une colonne de verre (10 cm X 1 cm) contenant déjà 1 millilitre de Dowex 50W-X2 ($NH4^+$). La colonne est lavée d'abord avec 10 millilitres d'acétate d'ammonium 0.2M (pH 6) ensuite avec 20 millilitres d'acide acétique 10%, enfin avec 30 millilitres d'eau distillée. Les éluats sont jetés. L'angiotensine est alors éluée avec 7 millilitres de diéthylamine 0.1N, suivie de 7 millilitres d'hydroxide d'ammonium 0.2N dans un erlenmeyer en polypropylène siliconé. L'éluat est congelé puis lyophilisé.

Le résidu sec est dissout dans 1 millilitre d'une solution de NaCl 0,9% et bacitracine 0,05% dont le pH a été ajusté à 7,5 par addition de bicarbonate de sodium solide. La réponse pressive obtenue lors de l'injection de la solution d'angiotensine à tester est comparée à celle donnée par une dose connue d'un standard de Valine-5-Angiotensine Asparti-que amide (Hypertensine Ciba) a deux niveaux différents au moins de pression artérielle.

2°) Dosage biologique

Des rats de 100 à 150 grammes, Sprague-Dawley sont néphrectomisés sous anesthésie à l'éther dix-huit heures

.../...

avant usage. Lors d'un dosage biologique, une pression artérielle plus stable est ainsi obtenue, pour une anesthésie plus douce et plus prolongée. Les rats sont anesthésiés avec du pentobarbital sodique (3 milligrammes intrapéritonéal et 4 milligrammes sous-cutané). Une trachéotomie est pratiquée, les veines jugulaires et l'artère carotide sont cannulées. La pression artérielle est enregistrée directement dans la carotide par un manomètre à mercure connecté à un kymographe ou par un transducteur de pression Statham (P23AC) connecté à un Polygraphe Grass. Des doses supplémentaires de pentobarbital sodique (1,2 milliligrammes) sont injectées à la demande pour maintenir une anesthésie profonde et une pression artérielle stable.

3°) Résultats

Rats néphrectomisés : Toute activité rénine décelable était absente du plasma de 30 rats mâles, néphrectomisés 24 heures auparavant.

Rats normaux : Comme nous le reverrons, des taux de 8 à 30 nanogrammes d'angiotensine ont été choisis comme limites de la normale.

D - MESURE DE LA RENINE RENALE

Le tissu rénal est mis dans de l'eau distillée (1 g/100 ml) et congelé à -20° C jusqu'au moment du dosage.

Le rein est décongelé à la température de la pièce puis recongelé deux fois, comme Haas l'avait suggéré (-) pour augmenter la rupture des cellules et la quantité de rénine libérée. Il est ensuite homogénéisé et centrifugé à 0-5° C. 0,1 ml de cet extrait brut, représentant 10 milligrammes de tissu rénal est ajouté à 3 millilitres (150 milli-

.../...

grammes) de substrat de rat et incubé une heure à 37° C et à un pH 6,5. La réaction enzymatique est arrêtée par refroidissement à 0-5° C et le milieu d'incubation est traité par un procédé identique à celui utilisé pour la mesure de l'Activité Rénine Plasmatique.

E - MESURE DE L'ANGIOTENSINOGENE PLASMATIQUE

L'angiotensinogène peut aussi être aisément mesurée. 0,1 millilitre de plasma est ajouté à 2 millilitres de tampon phosphate 0,25 M, pH 6,5. La solution est incubée 12 heures à 37° C en présence de 1 millilitre de Dowex 50W-X2 (NH_4^+) et de 2 unités de rénine de porc (100 unités/ml d'eau). Toutes les autres étapes de la méthode sont identiques à celles déjà écrites pour la mesure de l'Activité Rénine Plasmatique.

La quantité de substrat contenue dans 0,1 ml de plasma de rats binéphrectomisés permet d'obtenir 150 à 200 nanogrammes d'angiotensine sous l'action d'un excès de rénine. Dans les mêmes conditions la quantité d'angiotensinogène contenue dans 0,1 ml de plasma de rat normal ne permet la libération que de 30 nanogrammes d'angiotensine (7 expériences)

F - RECOUVREMENT ET REPRODUCTIBILITE

L'angiotensine ajoutée à du plasma de rat, à des taux allant de 100 à 500 millimicrogrammes a été mesurée dans six expériences différentes. Le recouvrement moyen a été de 74% (tableau 2). A du plasma de rat prétraité par la désoxycorticostérone et le sel, et dont l'Activité Rénine Plasmatique était ainsi supprimée, de très faibles quantités d'angiotensine ont été ajoutées (10) 50 mμg) les recouvrements ont été de 80% en moyenne (tableau 3).

.../...

RECOVERY OF ANGIOTENSIN ADDED TO RAT PLASMA IN AMOUNTS VARYING FROM 100 TO 500 m g IN EIGHT EXPERIMENTS

-=-=-=-=-=-=-

Experiment No.	Angiotensin added * (m g)	Plasma (ml) *	Angiotensin found (m g)	Recovery (%)
1 (control)		0,1	20	
2		0,1	20	
3	100	0,1	100	80
4	100	0,1	95	75
5	250	0,1	180	64
6	250	0,1	200	72
7	500	0,1	400	76
8	500	0,1	400	76
				Mean 74

* Added to rat substrate preparation, incubated at 37° C for 12 h at pH 6,5.

TABLE II

RECOVERY OF LOW CONCENTRATIONS OF ANGIOTENSIN ADDED TO PLASMA FROM RATS PRETREATED WITH DESOXYCORTICOSTERONE AND SALT LOADS

Experiment No.	Angiotensin added * (m g)	Plasma (ml)*	Angiotensin found (m g)	Recovery (%)
1 (control)		0,1	0	
2		0,1	0	
3	50	0,1	35	70
4	50	0,1	37	74
5	25	0,1	20	80
6	25	0,1	19	76
7	10	0,1	10	100
8	10	0,1	8	80
				Mean 80

* Added to rat substrate preparation, incubated at 37° C for 12 h at pH 6,5.

TABLE III

REPRODUCIBILITY OF RESULTS IN FIVE DETERMINATIONS WITH 0,1 ml OF PLASMA OBTAINED FROM A SEVERELY BLED RAT, AND FIVE DETERMINATIONS WITH KIDNEY RENIN EXTRACT

-=-=-=-=-=-

Experiment No.	Rat plasma* (ml)	Kidnay extracts* (g)	Angiotensin found (m g)
1	0,1		150
2	0,1		140
3	0,1		160
4	0,1		150
5	0,1		150
6		500	800
7		500	800
8		500	800
9		500	750
10		500	775

* Added to rat substrate preparation incubated at 37° C for 12 h at pH 6,5.

TABLE IV

Sur 5 rats la rénine a été mesurée deux jours de suite, sans anesthésie. Les valeurs obtenues étaient de 25 et 15 nanogrammes, 12 et 14, 15 et 15, 12,5 et 19, 12,5 et 14. Des déterminations en double ont été faites sur les mêmes échantillons de plasma. Les valeurs obtenues ont été de 25 et 19, 15 ey 16, 20 et 12,5, 12,5 et 10, 19 et 19, 14 et 14, 17 et 15, 15 et 10. Les résultats de 5 déterminations simultanées de l'Activité Rénine Plasmatique sur des échantillons de plasma provenant d'un même rat et de 5 déterminations avec 0,5 milligrammes du même extrait de reins sont donnés dans le tableau et montrent le haut degré de reproductibilité des résultats.

G - DISCUSSION

Le procédé de mesure de l'activité rénine est basé sur l'addition de plasma complet à un milieu d'incubation fait d'un excès de substrat homologue, ne contenant pas de rénine, et de résine Dowex 50W-X2 ($NH4^+$). Les méthodes qui tentent de purifier la rénine et le substrat sont longues et souvent accompagnées de pertes variables de rénine. C'est pourquoi nous avons choisi ce procédé plus pratique. Les résultats sont exprimés en nanogrammes d'angiotensine formés par 0,1 millilitre de plasma de rat binéphrectomisés a deux avantages :

- ce plasma ne contient pas de rénine
- il apporte sept à dix fois plus d'angiotensinogène.

Si l'incubation est prolongée au-delà de 12 heures de plus grandes quantités d'angiotensine sont formées. Ceci peut être intéressant pour les études des situations physiopathologiques où l'activité rénine diminue. Mais, en général, les taux d'angiotensine formés sont largement suffisants pour être facilement mesurés. Une incubation de 12 heures peut de

.../...

plus avoir lieu pendant la nuit, ce qui permet de mesurer l'activité rénine en deux jours.

Lorsqu'un lot de substrat a été préparé, il est nécessaire de vérifier chaque fois la quantité suffisante pour atteindre une réaction enzymatique d'ordre zéro. Il est arrivé plusieurs fois que l'on soit obligé d'utiliser des quantités de substrat supérieures à 150 milligrammes (jusqu'à 250 milligrammes). Un taux élevé d'Activité Rénine Plasmatique au moment de la néphrectomie peut être l'un des facteurs qui concourent à diminuer l'angiotensinogène disponible. Il est donc nécessaire d'éviter toute sécrétion excessive de rénine chez les rats destinés à la préparation du substrat. A cette fin, ils doivent être soigneusement hydratés dans les jours qui précèdent l'opération (un mélange de dextrose 1% et de NaCl 1% est très largement bu par les animaux). La néphrectomie est faite sous anesthésie au nembutal, qui s'est révélée moins susceptible que l'éther de libérer la rénine. Les études de GRANGER et coll.(142) sur le chien, ayant montré que l'infusion d'angiotensine à doses pressives avant la néphrectomie, permettait d'augmenter la quantité de substrat, de la Valine-5 Angiotensine II peut être de plus injectée aux rats, 45 minutes avant les néphrectomies (25 µg en suspension huileuse).

Les mesures de l'activité rénine d'extraits de reins sont faites en une heure, car ils contiennent de grandes quantités de rénine (environ 200 nanogrammes d'angiotensine sont libérés).

Il est donc maintenant possible de mesurer l'Activité Rénine Plasmatique du rat de façon spécifique et répétée, sur une quantité minime de plasma. Nous avons fait jusqu'à 6 déterminations d'Activité Rénine Plasmatique en 2 heures, chez des rats de 200 à 250 grammes, sans que la perte de sang ne modifie l'Activité Rénine Plasmatique.

L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE DU RAT NORMAL

A - MATERIEL

Les valeurs normales de l'A.R.P. ont été définies à partir des résultats obtenus chez 149 rats mâles, Sprague-Dawley, de 200±50 grammes obtenus de maison commerciale et isolés en cage métabolique depuis au moins 8 jours. Le régime normal associait le Purina Chow (180 mEq de sodium et 260 mEq de potassium par kilogramme)et l'eau du robinet à volonté. La température du laboratoire variait de 70° (hiver) à 80° (été). Le degré d'humidité n'était pas contrôlé. La nourriture était retirée aux animaux trois heures avant le prélèvement et l'accès à l'eau de boisson était laissé libre.

B - RESULTATS (Tableau 5).

Le taux moyen d'A.R.P. de 34 rats étudiés sans anesthésie a été de 15 nanogrammes (S.D. ± 5) d'angiotensine formée par 0,1 millilitre de plasma avec des limites de 8 à 25 nanogrammes. Du fait des difficultés de prélèvement, l'action de l'anesthésie légère sur l'A.R.P. a été testée.

Sous anesthésie à l'éther, à la phase d'hyperventilation, 31 rats sur 40 ont eu une A.R.P. comprise dans les limites normales. L'A.R.P. moyenne est de 23±5 nanogrammes, elle est significativement plus élevée qu'en l'absence d'anesthésie ($p < 0,01$) 9 rats ont un taux d'A.R.P. compris entre 25 et 80 na-

.../...

VALEURS NORMALES DE L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE DU RAT

-=-=-=-=-=-

	sans anesthésie	anesthésie légère à l'éther °	anesthésie légère au nembutal *
Nombre de déterminations	34	40	75
A.R.P. moyenne +	15 ± 5	23 ± 5	19,7 ± 9 ++
Nombre de rats dont l'A.R.P. dépasse 25 mg	1/34	9/40	11/75

\+ Nanogrammes d'angiotensine libérés par 0,1 ml de plasma

++ $p < 0,01$

° A la phase d'hyperventilation

* Animaux réagissant encore à la douleur

TABLEAU V

nogrammes. La libération de rénine due à l'anesthésie par l'éther est démontrée sur les 8 animaux dont les A.R.P. sont rapportées dans la figure -.

Sous anesthésie légère au nembutal (réaction à la douleur encore présente), la moyenne de l'A.R.P. mesurée sur 75 rats est 19 (S.D. $\pm$ 9) ; 11 animaux ont eu une A.R.P. comprise entre 25 et 50 nanogrammes.

C - DISCUSSION

La définition d'une valeur normale de l'A.R.P. est compliquée chez le rat par les difficultés rencontrées dans le contrôle de son activité et de ses ingestions liquidienne et alimentaire, par le stress dû à un prélèvement effectué sur un animal non anesthésié, par l'action des anesthésiques eux-mêmes.

Les résultats obtenus sur 149 rats permettent de définir une normale de l'A.R.P. comprise entre 8 et 25 nanogrammes d'angiotensine formée par 0,1 ml de plasma, en 12 heures, en présence d'un excès de substrat homologue. 14% des déterminations effectuées sous un régime standard se situent au-delà de 25 nanogrammes (entre 25 et 50 nanogrammes). Ceci contribue à rendre plus difficile l'interprétation des résultats obtenus chez des animaux qui, au cours d'une étude n'atteignent ou ne dépassent pas plusieurs fois 50 nanogrammes d'A.R.P.

Dans le même laboratoire, le Docteur ORTEGA a observé 12% d'index de granularité de l'appareil juxta-glomérulaire nettement plus élevés que la valeur normale (23 ± 6). Il est possible que certains animaux aient, à l'état basal, un taux plus élevé d'activité rénine plasmatique.

.../...

Des stimuli reproductibles, tels que l'hémorragie ou la restriction hydrique ont donné des valeurs absolues de rénine plasmatique plus élevées chez ces rats que chez les animaux normaux, mais le pourcentage d'augmentation a été le même. Une A.R.P. élevée peut cependant se rencontrer chez un rat normal qui réétudié plusieurs fois en d'autres circonstances a une A.R.P. comprise dans l'écart habituel. Le stress en particulier peut élever l'A.R.P. : un rat normal accidentellement coincé dans les barreaux de sa cage pendant une heure a eu une valeur de 150 nanogrammes.

L'anesthésie légère à l'éther, déjà connue pour libérer l'ACTH, les catécholamines, la vasopressine (143) est capable en moins de cinq minutes de libérer la rénine de certains rats. Cette sécrétion semblant moins nette sous anesthésie au nembutal, celle-ci a été préférée pour toutes les expériences de physiologie.

INFLUENCE DU CONTENU EN SODIUM DU REGIME SUR L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE DU RAT

-=-=-=-=-

MATERIEL

1°) Rats Sprague-Dawley de 200±50 grammes, obtenus de maison commerciale et isolés en cage métabolique depuis au moins 8 jours. Le régime dit normal associait le "Purina Chow" (180 mEq de sodium par kilogramme) et l'eau du robinet à volonté.

2°) Régime désodé : Nutritional Biochemical Corporation-Cleveland U.S.A. (6 mEq de sodium par kilogramme) et eau distillée à volonté.

3°) La courbe de poids a été ascendante dans tous les groupes d'animaux étudiés.

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

1°) Restriction sodée prolongée.

17 animaux ont été étudiés pendant un à deux mois. Six au printemps (température du laboratoire entre 20 et 25° centigrades. Sept en été (température du laboratoire entre 25 et 30° centigrades). Quatre en hiver (18 et 22° centigrades).

L'activité rénine plasmatique a été mesurée chaque semaine. Le rein gauche a été prélevé pour examen histologique moins de 3 jours après la dernière prise de sang. De plus, pendant les mois d'été, six animaux ont été laissés au régime sans sel pendant 3 mois mais leur activité rénine plasmatique n'a

.../...

été mesurée que le jour du sacrifice.

2°) Restriction sodée prolongée associée à l'administration d'hydrochlorothiazide (15 mg par kilo par jour par voie intra-péritonéale). Cinq animaux ont été étudiés pendant un mois au printemps. Six animaux ont été étudiés pendant deux mois en été.

Les mesures de l'activité rénine plasmatique ont toujours été faites 18 à 24 heures après l'injection intra-péritonéale d'hydrochlorothiazide, afin de ne pas tester l'effet aigü du diurétique sur la rénine

3°) Surcharge en sodium.

Les effets de l'addition de chlorure de sodium 1% dans l'eau de boisson ont été étudiés pendant un mois sur deux groupes de six rats (printemps et hiver).

4°) Surcharge en sodium et désoxycorticostérone.

Dix animaux buvant du chlorure de sodium 1% ont reçu de la désoxycorticostérone (Percotène Ciba) par voie sous-cutanée (1mg par kilo par jour). Quatre ont été sacrifiés au septième jour et six au vingt-et-unième jour).

RESULTATS

1°) Restriction sodée prolongée. Elle entraîne une disparition totale du sodium des urines, à partir du troisième-cinquième jour. Toutes les valeurs d'activité rénine plasmatique sont rapportées dans le tableau 6 . L'augmentation moyenne de l'activité rénine plasmatique est évidente mais la dispersion des valeurs obtenues est grande et chaque semaine, plusieurs

.../...

INFLUENCE DE LA RESTRICTION SODEE PROLONGEE
SUR L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE ET L'INDEX
JUXTA-GLOMERULAIRE DU RAT *

-=-=-=-=-

** RATS	0	8	15	22	29	36	43	50	60	A.R.P moyenne	IJG
1	25	20	50	45	70					46	30
2	12	38		25	12,5					25	34
3	20	37,5	50	37,5	60					46	42
4	7		12,5	40	20					24	40
5	25	22,5		25	20					22	14
6		27,5	37,5	62,5	10					34	18
7		30	65	37,5	75	30	25	40	50	44	40
8	20	50	125	90	100	50	70	150	70	88	45
9	12,5	100	120	60	100		140	125	140	112	82
10	15	20	77,5	50	90		100	100	150	90	52
11	10	25	30	30	50	80	50	50		45	42
12	20	50	60	30	35	25	75	50		46	61
13	10	18	32	22,5	50	22,5	50	75		38	29
14	20	15	50	20	20					26	26
15	7,5		20	20	20					20	20
16	7		20	18	20					19	14
17	6,5		50	50	25					41	25

* Nanogrammes d'angiotensine libérée en 12 heures par 0,1 ml de plasma

** Les rats de 1 à 6 ont été étudiés en avril-mai
Les rats de 6 à 13 ont été étudiés en aout et septembre
Les rats de 13 à 17 ont été étudiés en décembre et janvier.

TABLEAU VI

animaux ont des taux ne dépassant pas les valeurs hautes de la normale (25 à 30 ng/0,1 ml de plasma).

Il existe une très bonne corrélation (figure -) entre la moyenne des activités rénines plasmatiques mesurées en cours d'expérience et l'index de granularité des appareils juxta-glomérulaires compté à la fin de la période d'étude. Six rats sur dix-sept ont des index juxta-glomérulaires inférieurs à la limite supérieure des valeurs normales du laboratoire.

Sur les six animaux qui ont été laissés au régime désodé pendant 3 mois, cinq ont une activité rénine plasmatique élevée alors même qu'ils n'ont été soumis à aucune prise de sang. Quatre appareils juxta-glomérulaires sur six sont nettement hypergranulés (tableau 7).

2°) Restriction sodée associée à l'administration d'hydrochlorothiazide. Des traces de sodium persistent dans les urines, dues à l'action du diurétique.

Toutes les valeurs d'activité rénine plasmatique sont rapportées dans le tableau 8 . L'augmentation de l'activité rénine plasmatique est en moyenne plus nette que chez les rats au régime sans sel étudiés pendant les mêmes périodes de l'année, mais cinq fois encore, le résultat observé, n'a pas dépassé les valeurs hautes de la normale et deux animaux sur onze n'ont pas augmenté leur index de granularité de l'appareil juxta-glomérulaire.

Il existe une bonne corrélation entre l'hypergranularité de l'appareil juxta-glomérulaire et la valeur moyenne des activités rénines plasmatiques mesurées chez chaque animal (figure -).

.../...

INFLUENCE DE TROIS MOIS DE REGIME SANS SEL SUR L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE ET L'APPAREIL JUXTA-GLOMERULAIRE DU RAT +

RATS	A.R.P. ++	I.J.G.
1	125	50
2	150	40
3	75	48
4	40	33
5	40	28
6	25	19

\+ La mesure de l'Activité Rénine Plasmatique et le compte des granulations ont été faits le même jour

++ ng/0,1 ml de plasma.

TABLEAU VII

INFLUENCE DE LA RESTRICTION SODEE PROLONGEE ET DE L'HYDROCHLOROTHIAZIDE SUR L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE ET L'INDEX JUXTA-GLOMERULAIRE DU RAT ++

-=-=-=-=-

RATS +++	0	8	15	22	29	36	43	50	60	A.R.P. moyenne +	I.J.G.
1	20	60	100	62,5	27,5					62	37
2		50	40	25	20					34	23
3	22,5	55	50	85	27,5					54	30
4	15	50	50	30	17,5					37	34
5		50		55	30					47	30
6	15	40	75	40	90	60	60	50	100	64	18
7	12	50	80	60	90	60	50	50	75	87,5	53
8	18	62,5	100	60	140		50	50	150	87,5	40
9	10	40	120	75	160	60	80		120	93,5	67
10	25		100	75	150	70	200			119	63
11	14	125	70	70	75	45				77	50

\+ Nanogrammes d'angiotensine libérée en 12 heures par 0,1 ml de plasma

++ L'étude histologique de l'appareil juxta-glomérulaire a été faite dans les trois jours qui ont suivi la dernière prise de sang

+++ Les rats n° 1 à 5 ont été étudiés en avril-mai
Les rats n° 6 à 11 ont été étudiés en août et septembre.

TABLEAU VIII

3°) Surcharge en sodium.

Les deux groupes de rats étudiés ont montré les mêmes variations de l'activité rénine plasmatique et les valeurs moyennes sont rapportées dans le tableau 9.

Au quinzième jour, l'activité rénine plasmatique est significativement diminuée : 6 ± 3.

A la quatrième semaine du régime, elle n'est pas significativement différente des valeurs initiales ; deux animaux sur douze ont néanmoins une rénine indétectable par une incubation de douze heures. L'index juxta-glomérulaire est bas : 10 ± 4.

4°) Surcharge en sodium et désoxycorticostérone.

L'adjonction au chlorure de sodium dans l'eau de boisson d'un traitement par injections quotidiennes de désoxycorticostérone, supprime la rénine circulante chez tous les rats à partir du sixième jour. L'index juxta-glomérulaire est très abaissé ($7,5 \pm 7$). Au vingtième jour, alors que les animaux ne sont pas hypertendus (125 ± 8 mm Hg), l'activité rénine plasmatique est toujours supprimée et les appareils juxta-glomérulaires sont complètement dégranulés.

DISCUSSION.

Entre le huitième et le soixantième jour d'une restriction sodée prolongée, l'activité rénine plasmatique s'accroit et l'appareil juxta-glomérulaire s'hypergranule. Il avait déjà été démontré au cours du régime sans sel une augmentation constante des granulations de l'appareil juxta-glomérulaire accompagnée d'une augmentation du contenu en rénine du rein (15, 144,145) Nos résultats démontrent qu'il existe une très bonne corrélation entre l'élévation de la rénine circulante et celle de l'index de granularité.

.../...

INFLUENCE DU REGIME SALE SUR L'ACTIVITE RENINE PLASMATIQUE ET L'INDEX JUSTA-GLOMERULAIRE DU RAT

JOURS	Activité rénine + plasmatique moyenne	Nombre de rats dont l'A.R.P. est supprimée	I.J.G.
0	17 ± 5		
8	11 ± 4 ++	0/6	
15	6 ± 3 +++	2/12	
22	11 ± 7 ++	1/6	
29	12 ± 10 ++	2/12	10 ± 4 +++

\+ Nanogrammes d'angiotensine libérée en 12 heures par 0,1 ml de plasma.

++ non significatif

+++ $p < 0,05$

TABLEAU IX

L'adjonction au régime sans sel d'une injection quotidienne d'hydrochlorothiazide entraîne une fuite persistante de sodium dans les urines. L'activité rénine plasmatique moyenne s'élève davantage et plus constamment que chez les rats au régime sans sel, étudiés pendant la même période de l'année. La corrélation de la rénine circulante avec l'index de granularité de l'appareil juxta-glomérulaire est là encore très bonne et pour une même hypergranularité de l'appareil juxta-glomérulaire, la rénine circulante est significativement plus élevée chez les animaux traités par les diurétiques ($p < 0,05$). Il faut insister sur les larges variations d'activité rénine plasmatique observées d'une semaine à l'autre chez un même animal, alors que les prélèvements ont été effectués dans des conditions identiques d'horaire, d'anesthésie et d'hydratation.

Non seulement des valeurs normales d'activité rénine plasmatique peuvent se rencontrer occasionnellement chez des animaux déplétés en sodium dont la stimulation du système rénine-angiotensine est démontrée par l'ensemble des déterminations et l'hypergranularité de l'appareil juxta-glomérulaire, mais encore 6 animaux sur 28 ont une activité rénine plasmatique moyenne normale et 8 sur 28 un appareil juxta-glomérulaire normal.

FISHER également avait observé des appareils juxta-glomérulaires normaux au cours de la restriction sodée (146). Il est donc possible que chez certains rats, des facteurs autres que la rénine jouent un rôle important dans la conservation du sodium ou que celle-ci s'effectue par une stimulation faible du système rénine-angiotensine non détectée par nos techniques.

.../...

Si l'élévation de l'activité rénine plasmatique va de pair dans les expériences récentes avec l'hypergranularité de l'appareil juxta-glomérulaire, dans d'autres états expérimentaux telle l'insuffisance surrénalienne grave, la sécrétion de rénine dépasse de 50 à 100 fois la normale et l'appareil juxta-glomérulaire est dégranulé (147).

Dans nos expériences de restriction sodée, avec ou sans diurétiques, l'activité rénine plasmatique reste élevée après deux à trois mois d'observation. Il n'y a aucun retour à la normale de l'activité rénine plasmatique contrairement à ce qui a été noté par BOURGOIGNIE et COLL chez l'homme au cours des traitements diurétiques au long cours (148).

L'élévation de l'activité rénine plasmatique est plus importante et plus constante dans le groupe de rats étudiés pendant les mois d'été. Les pertes insensibles sont majorées par la chaleur et la stimulation du système rénine-angiotensine est ainsi plus intense : en expériences aigues, ROSENTHAL et COLL (149) ont démontré, par la même micro-méthode, que l'injection intra-veineuse de fursemide entraîne une sécrétion de rénine plus importante chez les rats vivants à 88° F que chez ceux élevés à 70° F.

Les changements de l'activité rénine plasmatique et de l'index juxta-glomérulaire dûs au régime riche en sodium avec ou sans désoxycorticostérone sont conformes aux résultats d'expériences analogues rapportés dans la littérature avec d'autres techniques (150).Le chlorure de sodium à 1% dans l'eau de boisson ne supprime pas complètement la rénine circulante et la moyenne des valeurs obtenues au vingt-neuvième jour est identique à celle obtenue en période contrôle. Une suppression

.../...

de l'activité rénine plasmatique est occasionnellement observée chez certains animaux, mais elle n'est pas constante d'une semaine à l'autre.

Constamment par contre, la rénine n'est plus détectable par une incubation de 12 heures, dans la méthode utilisée à partir du sixième jour d'un traitement par la désoxycorticostérone et le régime riche en chlorure de sodium. Après un mois de ce régime, l'activité rénine plasmatique est toujours nulle et l'appareil juxta-glomérulaire est complètement dégranulé.

Les expériences aigues ont permis de démontrer que la suppression de l'activité rénine plasmatique était liée à l'expansion du compartiment extra-cellulaire et non pas à l'action directe des hormones minéralo-corticoïdes sur l'appareil juxta-glomérulaire .

IMPORTANCE DES VARIATIONS DU VOLUME PLASMATIQUE
SUR LE DECLENCHEMENT DE LA SECRETION DE RENINE

-:-:-:-:-

A - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

1°) Hémorragies (Tableau 13).

Elles ont été faites sur 12 rats de 240±20 grammes. Chez cinq animaux, les deux reins étaient présents. 0,8 ml de sang ont été prélevés toutes les 30 minutes, jusqu'à 3,2 ml. Puis 1 ml a été prélevé toutes les 30 minutes jusqu'à un total de 6,2 - 6,5 ml de sang. Le même protocole a été réalisé sur 7 animaux après uninéphrectomie droite : 0,4 ml a été prélevé avant la néphrectomie et 0,4 ml 30 minutes après.

2°) Dialyses péritonéales.

a) Dialyse par le dextrose 5%

Elles ont été faites sur 8 rats de 200±10 grammes qui ont reçu dans la cavité péritonéale 10 ml de dextrose 5% à 37° par 100 grammes de poids. Le liquide a été laissé une heure, puis retiré en totalité par une petite incision médiane sus-pubienne. Les prélèvements de sang pour la mesure de l'Activité Rénine Plasmatique ont été effectués immédiatement après l'introduction du liquide dans la cavité péritonéale et immédiatement avant son extraction. L'Activité Rénine Plasmatique a été mesurée deux heures après la fin de la dialyse et 24 heures après.

b) Dialyse par le glucose 5% avec perfusion intra-veineuse de Mannitol 20%

Sept rats ont reçu dans la veine jugulaire par une

.../...

pompe à débit constant 0,04 ml/100 grammes/minute de Mannitol 20%. La perfusion a été commencée et arrêtée en même temps que la dialyse.

La vessie a été évacuée tous les quarts d'heure par pression sus-pubienne.

c) Dialyse par le glucose 5% avec perfusion intra-veineuse d'albumine humaine 25%

Quatre rats ont ainsi reçu 0,01 ml/100 grammes/minute pendant toute la dialyse péritonéale. Deux ont reçu 0,02 ml/100 grammes/minute pendant les 30 premières minutes de la dialyse.

d) Dialyse par le glucose 5% additionné de NaCl 1,4%.

Dix millilitres par 100 grammes de cette solution à 37° C ont été introduits dans la cavité péritonéale pendant une heure. L'Activité Rénine Plasmatique a été mesurée de la même façon que dans la première série d'expériences (6 animaux).

3°) Restriction hydrique de 72 heures

Groupe I : Seize rats de 200 ± 20 grammes n'ont reçu que 1 cm3 d'eau distillée par gavage chaque jour pendant 3 jours (l'ingestion liquidienne normale aurait été d'environ 20 ml par jour).

A la fin des 3 jours de privation d'eau, 6 rats ont bu de l'eau distillée et ont reçu une diète sans sel (N.B.C.) et six ont bu du chlorure de sodium 1% et ont reçu la diète standard Purina Chow.

Groupe II : Dix rats ont reçu chaque jour pendant les 3 jours de restriction hydrique 1 ml de NaCl 4% par gavage et 1 mg/Kg d'acétate de désoxycorticostérone (Percotène Ciba) en injection sous cutanée.

.../...

Groupe III : Douze rats ont reçu pendant 5 jours de la désoxycorticostérone (1 mg/Kg) sous-cutanée et ont bu du NaCl 1% à volonté. Le 6ème jour, après mesure de l'Activité Rénine Plasmatique, ils n'ont plus reçu pendant 72 heures qu'1 cm3 d'eau distillée par gavage.

Groupe IV : Quatorze rats, au 6ème jour d'un traitement analogue ont reçu chaque jour, pendant 3 jours, 1 cm3 de NaCl 4% par gavage, tandis que la désoxycorticostérone était poursuivie en injections sous-cutanées, à une dose identique.

B - RESULTATS

1°) Hémorragies

De 2 à 3,2 ml, chez des rats normaux, il existe une légère mais significative augmentation de l'Activité Rénine Plasmatique que les deux reins soient présents ou que l'animal ait été uninéphrectomisé immédiatement auparavant. L'augmentation de l'Activité Rénine Plasmatique devient très importante à la fin de l'hémorragie (6,2 ml de sang en 4 heures) tant chez les rats normaux que chez les uninéphrectomisés.

2°) Dialyses péritonéales

a) Par le dextrose 5%

Par ce procédé, 750 μEq de sodium par 100 grammes de poids sont soustraits en une heure de dialyse (75 mEq de sodium par litre dans le liquide de dialyse). Cette déplétion sodée sévère, comme l'ont rapporté d'autres auteurs (151) s'accompagne d'une augmentation de l'hématocrite (+8%), d'une diminution de la natrémie (125 mEq/l),d'une chute de la tension artérielle systolique (70 mm Hg en fin de dialyse) et d'une oligurie. L'Activité Rénine Plasmatique augmente progressive-

.../...

INFLUENCE DE L'HEMORRAGIE SUR L'A.R.P. DU RAT

-:-:-:-:-

Quantité de sang soustraite	0,4 ml CONTROLE	0,8 ml	1,6 ml	2,4 ml	3,2 ml	4,2 ml	5,2 ml	6,2 ml
1) avec les deux reins								
1	12,5							125
2	15		27,5	30	50	100		170
3	7,5		7,5	10	20	15	30	60
4	15		10	30	35	35	40	100
5	10							
Moyenne	12		15	23	32	50	35	106
2) après néphrectomie droite								
6	7,5						85	100
7	20							150
8	20							150
9	50	30	45	45	60		150	300
10	35	30	40				70	120
11	8	15	18	22	25		60	120
12	17,5	7,5			40			80
Moyenne	21	20,5	34	33	42		91	145

TABLEAU XIII

ment pendant la dialyse et revient à la normale 24 heures après, les animaux étant laissés en régime normal.

b) Par le glucose 5% avec perfusion intra-veineuse de Mannitol 20%

L'augmentation de l'hématocrite et la sécrétion de rénine sont simultanément inhibées.

La concentration en sodium du liquide de dialyse est de 80 µEq/l à la fin de l'expérience. Dans la demi-heure qui suit l'arrêt de la dialyse et de l'infusion, l'hématocrite et l'Activité Rénine Plasmatique s'élèvement simultanément, tandis que la diurèse osmotique (0,01 ml/100 grammes/minute) se poursuit (fig. 5).

c) Par le glucose 5% avec perfusion intra-veineuse d'albumine humaine 25%

En l'absence de toute diurèse osmotique, les changements de l'Activité Rénine Plasmatique et de l'hématocrite sont là encore simultanément inhibés (Tableau 10).

La concentration en sodium du liquide de dialyse est de 85 µEq/l en fin d'expérience.

Deux des animaux en dépit d'une élévation discrète de l'hématocrite trente minutes après l'arrêt de l'expérience, n'ont jamais élevé leur activité rénine plasmatique.
Il n'y a pas d'augmentation de l'A.R.P. lorsque l'albumine est infusée au rythme de 0,02 ml/100 g/minute seulement pendant les 30 premières minutes de la dialyse.

d) Par le glucose 5% additionné de NaCl 1,4%

La dialyse hypertonique retire en une heure 4,8% du poids corporel sous forme d'eau recueillie dans le liquide de dialyse.

.../...

EFFECT OF PERITONEAL DIALYSIS ON RENIN ACTIVITY AND HEMATOCRIT

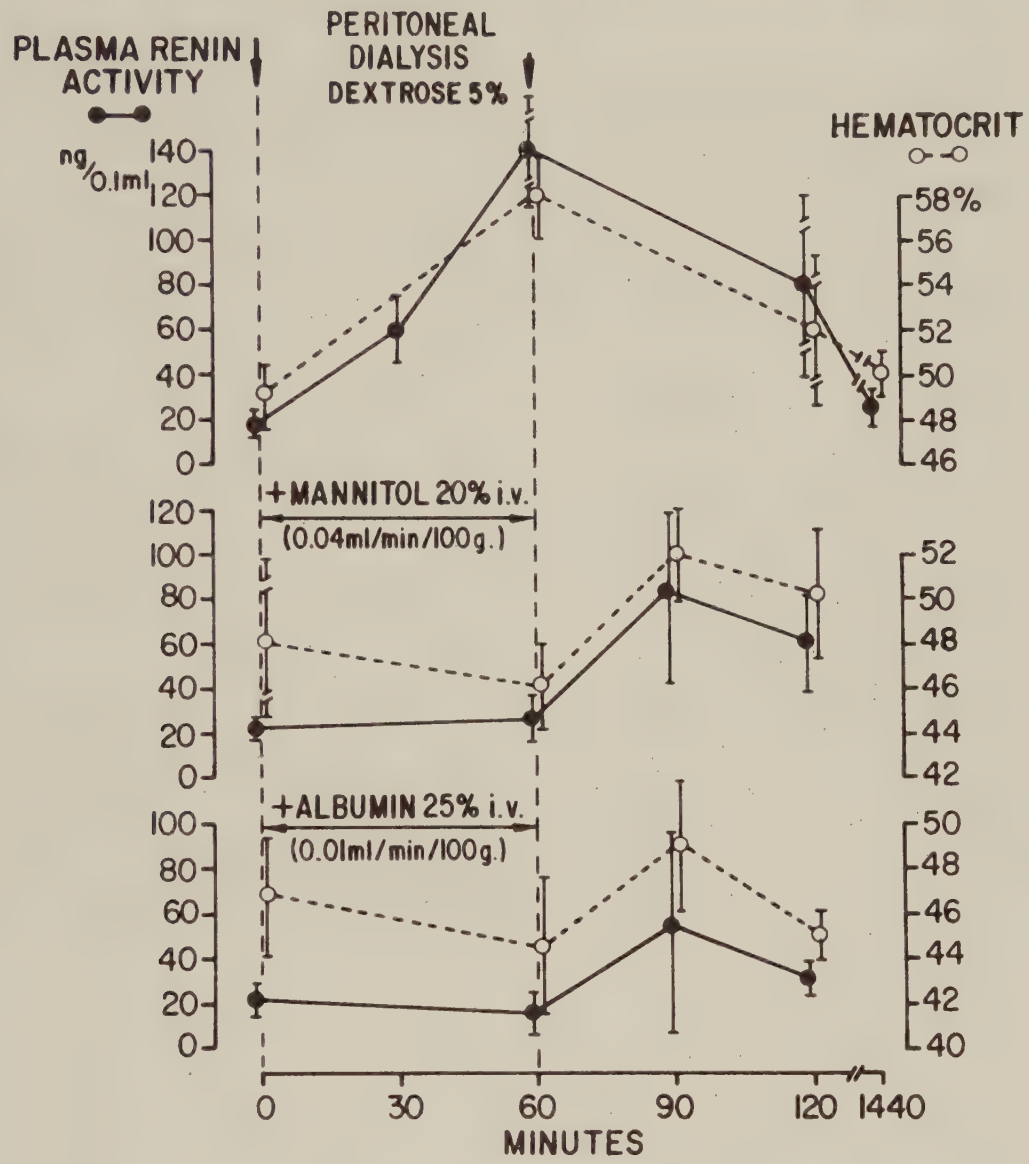

FIGURE 5

INFLUENCE OF EXTRA-RENAL ACUTE Na LOSSES ON PLASMA RENIN ACTIVITY (PRA)* AND HEMATOCRIT (HT)

INHIBITORY EFFECT OF EXPANSION OF BLOOD VOLUME

		CONTROL	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 Hrs
PERITONEAL DIALYSIS (60) *(DEXTROSE 5%)* 8 RATS	PRA	19 ± 4	60 ± 15	140 ± 70	—	80 ± 40	25 ± 7
	HT	49 ± 1.5	—	57 ± 2		52 ± 15	50 ± 1
PERITONEAL DIALYSIS (60) *(DEXTROSE 5%)* + MANNITOL 20% i.v. 04ml/min/100g 7 RATS	PRA	21 ± 4	—	27 ± 11	84 ± 42	60 ± 22	
	HT	48 ± 25		46 ± 2	52 ± 2	50 ± 3	
PERITONEAL DIALYSIS (60) *(DEXTROSE 5%)* + ALBUMIN 25% .01ml/min/100g. 4 RATS	PRA	21 ± 6	—	16 ± 9	54 ± 47	30 ± 9	
	HT	47 ± 3		44 ± 3	49 ± 3	45 ± 1	

* *PRA - ng ANGIOTENSIN / 0.1ml PLASMA / 12 HRS*

TABLEAU X

Elle apporte 950 µEq de sodium par 100 g du poids en une heure, tandis que la natrémie s'élève à 160 mEq/l. En fin de dialyse, il n'y a pas de changements significatifs de l'hématocrite ni de l'A.R.P., qui sont par contre tous deux abaissés 24 heures plus tard (Tableau 11).

INFLUENCE DE LA DIALYSE PERITONEALE PAR LE GLUCOSE 5% ADDITIONNE DE NaCl 1,4% SUR L'A.R.P. DU RAT (6 rats)

Tableau XI

Temps	0	60 minutes	24° heure
Activité Rénine Plasmatique	23 ± 16	15 ± 9 *	9 ± 25 **
Hématocrite	48 ± 45	46 ± 4,8 *	40,6±2,3**

* non significatif
** $p < 0,01$

3°) Restriction hydrique de 72 heures

Elle accroit progressivement l'Activité Rénine Plasmatique. L'hématocrite s'élève et la natrémie dépasse 160 mEq/l. Le volume urinaire diminue, l'osmolarité urinaire croît et la quantité de sodium perdue dans les urines en 24 heures diminue peu à peu. La perte de poids est de 18,9% (tableau 12). Quatre animaux avaient pour des raisons inconnues, une A.R.P. de départ élevée (50, 50, 37,5 et 30 nanogrammes). La restriction hydrique a augmenté leur A.R.P. dans les mêmes proportions que les animaux normaux (250, 250, 200 et 200 nanogrammes). Ils ont été retirés de la moyenne des résultats.

.../...

EFFETS DE LA RESTRICTION HYDRIQUE DE TROIS JOURS

-:-:-:-:-

	nombre	contrôle	24 heures	48 heures	72 heures
Activité Rénine Plasmatique	12	16±4		65,6±12	92±20
Hématocrite %	9	49,3±0,9		54,9±2,8	57,4±2
Poids (grammes)	6	201±11	185±13	174±13	163±12
Volume urinaire (ml/24 heures)	6	9±1,8	5,2±2,1	4,4±0,9	2,7±1,1
Sodium urinaire (µEq/24heures)	6	1976±320	1506±452	808±57	366±199
Osmolarité Urinaire (mOsm/L)	6	2144±273	2659±512	3151±408	3381±410

TABLEAU XII

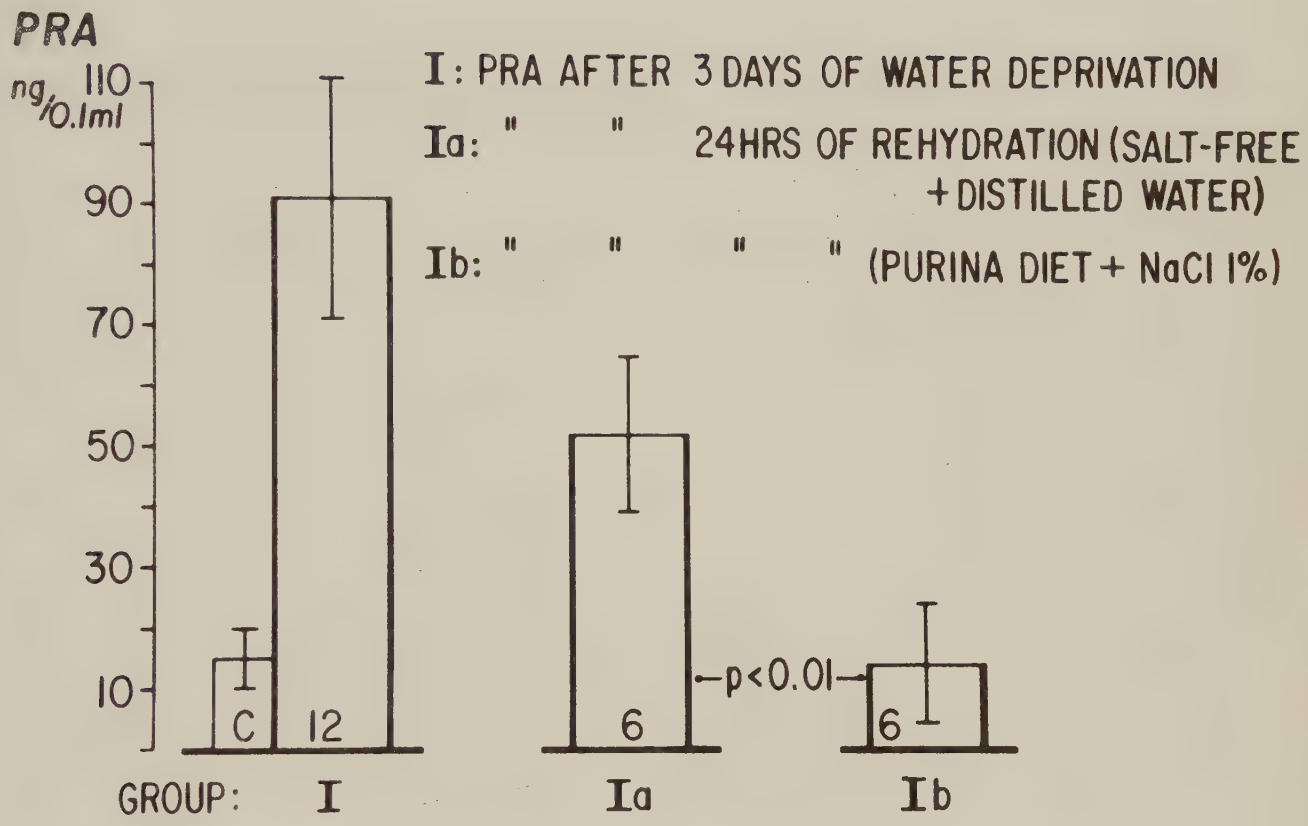
PRA
ng/0.1ml
110
90
70
50
30
10
I: PRA AFTER 3 DAYS OF WATER DEPRIVATION
Ia: " " 24HRS OF REHYDRATION (SALT-FREE + DISTILLED WATER)
Ib: " " " " (PURINA DIET + NaCl 1%)
C
12
6
6
p<0.01
GROUP:
I
Ia
Ib

FIGURE 6

EFFECTS OF WATER DEPRIVATION
WITH OR WITHOUT DOC AND SALT ADMINISTRATION
ON PLASMA RENIN ACTIVITY

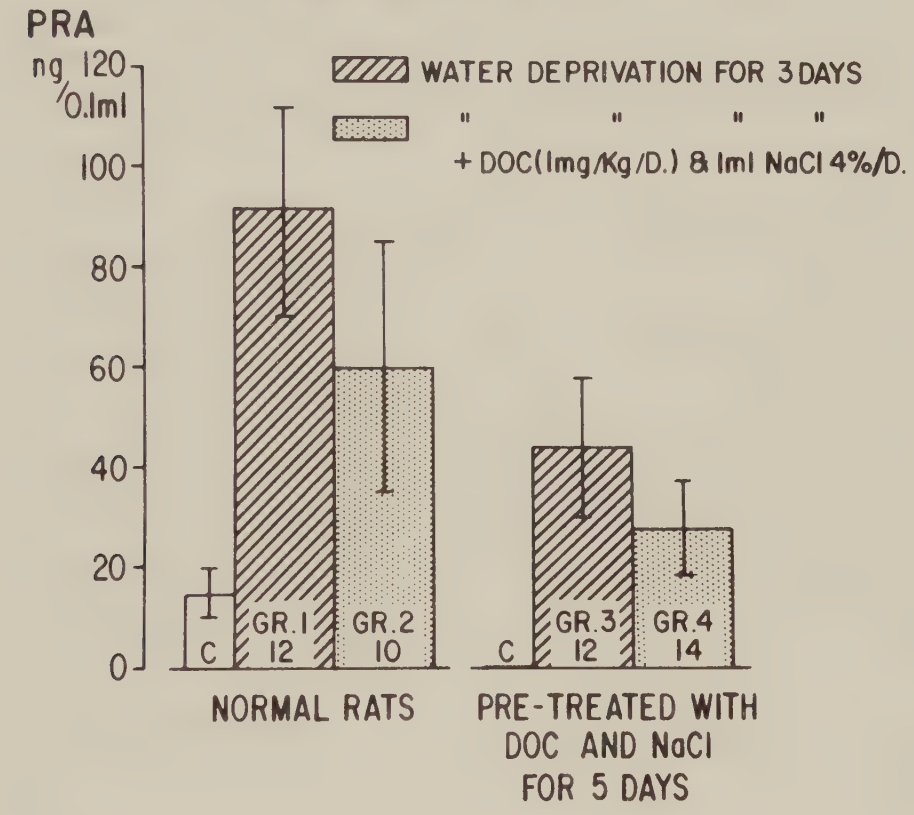

FIGURE 7

Après 72 heures de restriction hydrique, les 6 rats laissés 24 heures à la diète sans sel et à l'eau distillée ont une A.R.P. beaucoup plus élevée ($p<0,01$) que 6 autres rats mis au régime normal et au NaCl 1% dans l'eau de boisson (fig.6).

Les valeurs d'A.R.P. obtenues dans les différents protocoles de privation d'eau associés à l'administration de désoxycorticostérone et de NaCl sont représentées dans la figure 3.

L'administration de désoxycorticostérone et de sodium à des rats normaux pendant la privation d'eau (Groupe II) n'empêche pas l'élévation de l'A.R.P. ; elle en diminue l'importance ($p<0,01$).

Le groupe des rats pré-traités par le NaCl 1% et la désoxycorticostérone et dont l'A.R.P. est supprimée (Groupe III) augmente moins leur A.R.P. que les rats au régime normal ou que les rats recevant de la désoxycorticostérone (Groupe II) ($p<0,05$).

La poursuite du traitement minéralo-corticoïde pendant la restriction hydrique (Groupe IV) diminue encore plus la montée de l'A.R.P. ($p<0,01$) : son taux après 3 jours de privation d'eau est alors à peine supérieur à celui observé chez des rats normaux (fig.7).

C - DISCUSSION

Les changements de l'A.R.P. observés lors de l'hémorragie et de la déplétion sodée aigue par dialyse péritonéale au dextrose 5% démontrent l'analogie du comportement du système rénine-angiotensine du rat avec celui des autres espèces animales.

L'effet de l'hypovolémie induite par hémorragie a été testée par toutes les méthodes chez le lapin, le chien, l'homme et le rat (152, 153, 154, 155).

.../...

Les expériences faites sur des rats de 250 grammes montrent que, dans l'intervalle de temps choisi, une sécrétion importante de rénine n'apparaît que lorsqu'environ 20% du volume sanguin ont été soustraits. Ceci laisse une large marge d'utilisation à la micro-méthode de dosage de rénine (0,3 ml de sang). Si l'Activité Rénine Plasmatique n'augmente de façon importante qu'à une phase assez tardive de l'hémorragie, des changements minimes à la limite de la sensibilité de la méthode sont en fait détectables précocement dans quatre expériences.

Il est bien démontré que cette sécrétion de rénine est d'origine rénale (155). Elle ne nécessite pas pour se produire la présence des deux reins. Dans ces expériences aigues, l'élévation de l'A.R.P. est identique qu'il y ait deux ou seulement un rein présent.

Dans la perte extra-rénale de sodium réalisée par la dialyse péritonéale du dextrose 5% ; la montée de l'A.R.P. est immédiate, comme chez l'homme après injection intra-veineuse d'un diurétique d'action rapide (156, 157, 158) . Ces variations ne sont pas dues à la dialyse elle-même ni aux changements de pression intra-abdominale qu'elle entraîne. En effet, il n'y a pas de modifications de l'A.R.P. au cours de la dialyse hypertonique. Un animal buvant du NaCl 1% depuis 9 jours et recevant de la désoxycorticostérone (1 mg/Kg sous-cutané/24 heures) a subi une dialyse péritonéale au dextrose 5%. Il n'y a pas eu de réapparition de l'A.R.P. supprimée par ce traitement.

Il s'agit d'une sécrétion de rénine et non d'une concentration de la rénine déjà en circulation ou de l'apparition d'un éventuel activateur de la réaction enzymatique. En effet,

.../...

l'élévation de l'A.R.P. est beaucoup plus importante que celle de l'hématocrite. La rénine disparaît très rapidement de la circulation comme le confirment les valeurs d'A.R.P. obtenues en une heure après la néphrectomie bilatérale de 6 rats, dont l'A.R.P. avait été élevée par les restrictions hydriques ou le régime sans sel (tableau 14). Un septième animal a été dialysé immédiatement après binéphrectomie : son A.R.P. est tombée de 70 à 10 nanogrammes. Deux rats normaux binéphrectomisés et dialysés ont eu 0 et 6 nanogrammes d'A.R.P. en fin de dialyse.

La déplétion sodée aigue par voie extra-rénale a la même action sur l'A.R.P. que la déplétion due à l'injection d'un diurétique. La natriurèse n'est donc pas en soi le stimulus de la sécrétion de rénine.

La baisse du volume plasmatique, appréciée sur l'augmentation de l'hématocrite semble par contre être le facteur nécessaire à son déclenchement. Lorsque l'hypovolémie est supprimée par la perfusion simultanée de Mannitol hypertonique, il n'y a pas d'augmentation de l'A.R.P. en dépit d'une hyponatrémie encore plus nette que celle observée lors de la dialyse péritonéale isolée. L'albumine humaine désodée, qui n'entraîne aucune diurèse osmotique, inhibe encore plus nettement la sécrétion de rénine, en dépit de la même déplétion sodée par la dialyse. Ceci confirme les résultats obtenus chez l'homme lors des natriurèses dues à l'injection intra-veineuse, d'acide éthacrynique : l'expansion volémique sans remplacement des pertes rénales en sodium inhibe la sécrétion de rénine (157).

Le mécanisme de l'action des variations du volume plasmatique sur la sécrétion de rénine reste à élucider : effet direct sur la pression de perfusion de l'artériole afférente changement de la réabsorption tubulaire proximale du sodium

.../...

VITESSE DE DISPARITION DE LA RENINE APRES BINEPHRECTOMIE

-:-:-:-:-

	Avant néphrectomie	Après néphrectomie (60 minutes)
Restriction hydrique (4 jours)		
1	150	15
2	150	10
3	300	40
4	160	25
Régime sans sel (15 jours)		
5	30	10
6	50	8
7	70	10
		(+ dialyse péritonéale)

TABLEAU XIV

perçu au niveau de la macula densa (115) ou mise en jeu du système nerveux sympathique par des baro-récepteurs dont la localisation reste à préciser (159). De plus, réserve faite de la disparité de la dynamique des phénomènes observés, les baisses du volume plasmatique sont beaucoup plus efficaces sur la libération de rénine lorsqu'elles sont dues à une fuite sodée que lorsqu'elles sont obtenues par la déplétion volémique directe de l'hémorragie.

Les dialyses hypertoniques démontrent qu'une déplétion hydrique massive mais réalisée aux dépens du seul compartiment intra-cellulaire ne modifie pas l'A.R.P. L'apport de sodium et l'expansion du compartiment extra-cellulaire se traduisent 24 heures après par une baisse de l'A.R.P. et de l'hématocrite.

La privation d'eau réalise comme chez l'homme un déficit hydrique associé à une perte de sodium dans les urines. En présence d'une natrémie supérieure à 160 mEq/l, l'A.R.P. s'élève six fois. La réduction du volume plasmatique appréciée sur l'élévation de l'hématocrite et mesurée par des techniques isotopiques, dans des expériences analogues (160) s'accompagne là encore d'une sécrétion de rénine. Le fait que les rats cessent pratiquement de s'alimenter lors de la privation d'eau ne perturbe pas l'interprêtation des taux d'A.R.P. obtenus, puisqu'au cours du jeûne avec accès libre à l'eau de boisson, l'A.R.P. n'est pas modifiée.

Le retour à la normale de l'A.R.P. dans les 24 heures de réhydratation qui suivent la restriction hydrique dépend de l'apport sodé du régime (rats des groupes Ia et Ib).

La privation d'eau réalise une situation expérimentale où la synergie entre ADH et rénine est particulièrement

.../...

évidente. Dans les autres protocoles, anesthésie par l'éther, hémorragie et déplétion sodée aigue par dialyse péritonéale, une libération d'ADH a également été démontrée (161, 162). Le parallélisme vraisemblable des variations du système rénine-angiotensine et de la vasopressine doit dont être souligné, au même titre que l'ont été les variations simultanées de catécholamines et de la rénine (159).

L'administration de déscxycorticostérone au cours de la restriction hydrique n'empêche pas la montée de l'A.R.P., elle en diminue l'importance. La mesure exacte du volume plasmatique par l'albumine I 131 au cours de la restriction hydrique a montré que la baisse du rapport $\frac{\text{volume plasmatique}}{\text{poids corporel}}$ était freinée par l'administration de désoxycorticostérone (160) ; ceci explique la diminution de la sécrétion de rénine.

Les résultats obtenus sur les quatre groupes d'animaux étudiés démontrent deux faits :

1) Il n'y a pas d'action directe des hormones minéralocorticoïdes sur la sécrétion de rénine. La déshydratation extracellulaire induite par la restriction hydrique n'a pas été prévenue par l'administration de désoxycorticostérone : en dépit d'un large excès de minéralo-corticoïdes, l'A.R.P. croît. Le feed-back entre la surrénale et l'appareil juxta-glomérulaire est indirect, par l'intermédiaire des variations de la balance sodée et de la volémie.

2) La sécrétion de rénine s'adapte avec précision au niveau de la balance sodée. En présence d'un même stimulus aisément reproductible en fonction de l'apport en sodium avant et pendant l'expérience, quatre niveaux différents d'A.R.P. ont été obtenus. La signification des différentes variations d'A.R.P. constatées est la même mais le chiffre brut ne peut s'interpréter que confronté à l'état de la balance sodée avant et pendant l'expérience.

ooo
o

REINTERPRETATION DES DONNEES DE LA LITTERATURE CONCERNANT LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE DANS DIVERS ETATS PATHOLOGIQUES

-:-:-:-:-:-

A - INTRODUCTION

Les mesures de la concentration rénale de la rénine et de l'Activité Rénine Plasmatique de l'animal ou de l'homme permises par les progrès méthodologiques récents n'ont pas démontré la responsabilité du système rénine-angiotensine dans l'hypertension artérielle d'origine rénale. Il est en effet apparu clairement :

1°) que la sécrétion physiologique de la rénine est fonction inverse du bilan sodé ;

2°) que la sécrétion de la rénine est accrue au cours de diverses conditions ne comportant pas d'hypertension artérielle, telles que la grossesse et les syndromes oedémateux ;

3°) que l'Activité Rénine Plasmatique est inconstamment élevée dans les hypertensions expérimentales d'origine rénale (163) et dans les hypertensions réno-vasculaires humaines (129, 164, 165). Chez le rat (166) et le lapin (167) rendus hypertendus par sténose partielle d'une artère rénale, la concentration de la rénine du rein clampé augmente lorsque le rein sain opposé est en place. Si le rein sain est ôté en même temps qu'on place le clamp artériel, l'hypertension apparaît, mais la concentration de rénine du rein clampé n'augmente pas. Ce résultat a fait "exclure le rôle déterminant de la rénine dans la production et le maintien de l'hypertension

.../...

Une surcharge en sodium et en DOCA diminue considérablement la concentration rénale de la rénine. Chez des rats (168) ou des lapins (169) ainsi déplétés en rénine, la pose d'un clip sur une artère rénale fait cependant apparaître une hypertension comparable dans son importance et dans sa chronologie à celle qui survient chez des animaux normaux. Ces résultats ont fait conclure que "la rénine ne constitue pas un chaînon essentiel dans la pathogénie de l'hypertension rénale expérimentale".

Trois groupes de recherches étudiant l'Activité Rénine Plasmatique par deux méthodes différentes dans de grandes séries d'hypertensions artérielles humaines avec sténose artérielle rénale unilatérale, ont obtenu des résultats superposables : l'activité rénine mesurée dans le plasma veineux périphérique n'est augmentée que dans 45 à 65% des hypertensions artérielles humaines avec lésions réno-vasculaires significatives .
La confrontation de l'évolution postopératoire aux valeurs basales de l'Activité Rénine Plasmatique déterminée avant l'intervention chirurgicale montre qu'il existe 36% d'hypertendus guéris ou améliorés par la chirurgie rénale ou réno-vasculaire ayant une Activité Rénine Plasmatique veineuse périphérique normale.

B - RAPPEL DE CERTAINS RESULTATS EXPERIMENTAUX

1°) Les variations du volume sanguin modifient la sécrétion de rénine. Chez l'homme normal, l'injection d'un diurétique puissant tel l'acide éthacrynique,du fait de l'hypernatriurèse, réduit le volume sanguin, sans modifier significativement ni la pression artérielle ni la natrémie, et augmente l'Activité Rénine Plasmatique. La perfusion d'une solution désodée

.../...

de macromolécules augmente le volume sanguin (157) et supprime la sécrétion en rénine.

Comme nous l'avons décrit, une hypovolémie aigue réalisée par soustraction extra-rénale de sodium (dialyse péritonéale par le dextrose 5%) provoque chez le rat une augmentation de l'Activité Rénine Plasmatique mesurée par micro-méthode.

L'association à la dialyse péritonéale d'une perfusion intra-veineuse de Mannitol 20%, ou d'albumine désodée 25%, à une dose suffisante pour inhiber la montée de l'hématocrite, prévient l'hypersécrétion de la rénine, malgré la perte sodée.

Ces deux expériences démontrent que l'hypersécrétion de rénine dépend des variations du volume sanguin. Elles ne précisent cependant pas par quel mécanisme la sécrétion de la rénine dépend des variations volémiques. Toute modification du volume plasmatique ou extra-cellulaire modifie la réabsorption tubulaire proximale du sodium et donc la composition de l'urine en regard de la macula densa. Toute modification du volume plasmatique ou du volume extra-cellulaire, perçue au niveau du baro-récepteur de l'organisme, retentit sur le système nerveux sympathique.

2°) Les variations de la pression artérielle modifient la sécrétion de rénine. Indépendamment de toute hypovolémie, le niveau même de la pression artérielle semble être un deuxième stimulus de la sécrétion de rénine. L'hypotension rapide induite par infusion d'hydralazine (170) ou par injection de diazoxide (171) augmente chez l'homme la sécrétion de rénine.

Inversement chez le chien, la stimulation de la sécrétion de la rénine provoquée par perfusion de noradrénaline n'apparaît que si le rein est protégé contre l'élévation de la pression artérielle par un clampage progressif de son artère (65).

.../...

3°) L'interprétation d'une valeur d'Activité Rénine Plasmatique doit tenir compte de la balance sodée antérieure : un stimulus précis provoque des changements de l'Activité Rénine Plasmatique variables en fonction de la balance sodée. La restriction hydrique de trois jours augmente l'Activité Rénine Plasmatique du rat. L'augmentation est toujours flagrante en valeur relative, mais chez le rat préalablement placé en balance sodée positive, les valeurs d'Activité Rénine Plasmatique obtenues en fin de stimulation sont en valeur absolue, voisines de la normale ; une Activité Rénine Plasmatique normale en valeur absolue peut donc très bien traduire une hypersécrétion de rénine si le bilan sodé a été au préalable rendu positif.

4°) L'estimation de la concentration rénale de la rénine ne permet pas de prévoir les valeurs de l'Activité Rénine Plasmatique.

Une hypovolémie aigue induite par hémorragie augmente l'Activité Rénine Plasmatique sans que l'on puisse déterter une variation concomitante de la concentration rénale de la rénine

C - HYPERTENSIONS ARTERIELLES EXPERIMENTALES

Ces résultats expérimentaux permettent de réinterpréter les expériences plaidant apparemment contre le rôle pathogénique du système rénine-angiotensine dans l'hypertension artérielle d'origine rénale.

1°) La sécrétion de la rénine est très augmentée lorsqu'un rein sain est présent en face du rein clampé. La cause première de la sécrétion de la rénine est la sténose artérielle rénale. A l'hypersécrétion de rénine fait suite une hypersécrétion d'aldostérone ; la tension artérielle augmente. Le rein sain

.../...

controlatéral répond à ces variations hémodynamiques et peut-être aussi à l'augmentation de l'angiotensine (172) par une natriurèse (173) et un arrêt de sa propre synthèse et sécrétion de rénine. La fuite sodée due à la présence de ce rein sain réduit la volémie et contribue à prolonger et à accroître la sécrétion de rénine du rein clampé dont le contenu en rénine augmente.

L'ablation du rein sain opposé au rein clampé empêche cette natriurèse ; la rétention sodée est plus importante que dans l'expérience précédente (174). L'élévation de la volémie qui en résulte (175) s'oppose à l'augmentation de la rénine dans le rein clampé mais aucun fait ne permet d'exclure une hypersécrétion de rénine à la phase initiale, c'est-à-dire lorsque le clim est posé sur l'artère rénale.

2°) Rien ne permet d'affirmer que l'hypertension artérielle provoquée par la sténose partielle des artères rénales chez des animaux à concentration rénale de rénine diminuée par la surcharge sodée préalable, n'est pas liée à une hypersécrétion de rénine :

a) la rénine plasmatique n'a jamais été dosée dans ce type d'expérience et nous avons vu la limite de la signification des dosages de rénine rénale,

b) l'hypersécrétion de rénine de ces animaux est néanmoins selon toute vraisemblance réduite en valeur absolue, mais nous avons vu que l'interprétation d'une sécrétion de rénine doit tenir compte du bilan sodé antérieur.

3°) Le régime désodé ne prévient pas et ne guérit pas l'hypertension rénale expérimentale (176) : la sécrétion de la rénine reste trop importante pour la volémie et la quantité d'angiotensine formée est toujours trop grande pour le bilan sodé.

.../...

4°) L'interprétation des valeurs normales d'Activité Rénine Plasmatique trouvée à la phase chronique des hypertensions rénales expérimentales doit être faite selon les mêmes principes : la balance sodée de l'hypertension artérielle expérimentale a été positivée par l'hypersécrétion de rénine et d'aldostérone de la phase initiale. Les valeurs dites "normales" d'Activité Rénine Plasmatique sont donc, en réalité inadaptées au bilan du sodium et il est bien prouvé, in vitro (177) comme in vivo (127) que la positivité du bilan sodé potentialise fortement l'action vasoconstrictrice de l'angiotensine.

D - HYPERSECRETION DE RENINE SANS HYPERTENSION ARTERIELLE

Les changements de la répartition de la masse sanguine peuvent augmenter la sécrétion de la rénine comme le font les baisses réelles de la volémie ou de la pression artérielle : lors de l'orthostatisme, l'accumulation du sang dans les membres inférieurs augmente l'Activité Rénine Plasmatique (69) ; cette augmentation peut être prévenue par le bandage des membres inférieurs (178). Les conséquences de l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone sont l'expansion compensatrice du volume plasmatique (179). L'intervention directe de l'angiotensine formée dans le maintien de la pression artérielle est possible et reste à prouver.

Anomalies de répartition de la masse sanguine et hypervolémie globale sont constatées dans de très nombreuses autres conditions :

1°) Les varices importantes, qui accentuent l'accumulation physiologique du sang dans les membres inférieurs en position debout, peuvent s'accompagner d'une hypervolémie (180).

.../...

2°) L'hypervolémie est également constatée au cours de fistules artérioveineuses importantes (181) qui à leur création abaissent la pression artérielle moyenne (182).

3°) L'augmentation du volume sanguin survenant au cours de la grossesse est parallèle au développement du placenta (43) et proportionnelle à son poids (183) : l'augmentation du volume sanguin est particulièrement nette au cours des grossesses gémellaires (

4°) L'hypervolémie des cirrhoses est proportionnelle à la stase splanchnique due au bloc intrahépatique : l'augmentation de la masse sanguine est porportionnelle à la pression sus-hépatique bloquée (184) et à l'hypertension portale appréciée par son retentissement clinique (184-185).

Dans toutes ces conditions, la tension artérielle est normale et malgré l'hypervolémie, la sécrétion de la rénine est accrue. L'association d'une hypersécrétion de la rénine et d'une hypervolémie peut sembler paradoxale : elle est contraire aux résultats expérimentaux exposés précédemment, sauf si l'on admet que l'hypervolémie est la conséquence de l'hypersécrétion de la rénine. Le fait premier est l'anomalie de répartition de la masse sanguine : la stase sanguine dans les membres inférieurs ou dans le secteur splanchnique, la dérivation du sang dans le placenta déclenchent la sécrétion de la rénine ; l'hyperaldostéronisme secondaire est le facteur majeur de l'hypervolémie. Les cirrhotiques qui ont eu des hémorragies digestives ont les volumes plasmatiques les plus élevés (185), les mêmes cirrhotiques ont les appareils juxtaglomérulaires les plus granulés (186).

.../...

L'hypersécrétion de la rénine persiste malgré l'hypervolémie parce que l'anomalie de répartition de la masse sanguine demeure ; la sécrétion de rénine est même majorée lorsqu'aux anomalies pathologiques de répartition de la masse sanguine, s'ajoute une anomalie physiologique telle l'orthostatisme. Le repos au lit, diminuant la sécrétion de rénine est d'ailleurs susceptible de supprimer les rétentions hydrosodées en dehors de toute restriction du sodium alimentaire (187).

Le contraste entre l'hypersécrétion de rénine et la normotension constatées dans ces conditions peut s'expliquer ainsi: dans les restrictions sodées, dans les anomalies de répartition de la masse sanguine réalisées par la grossesse ou la cirrhose, comme d'ailleurs dans les états d'insuffisance cardiaque, la sécrétion de la rénine est appropriée aux perturbations hémodynamiques : l'angiotensine par son action stimulante sur la production d'aldostérone s'oppose aux changements volémiques ; l'angiotensine, par son action vaso-constrictrice directe concourt peut-être aussi à la correction de l'hypotension artérielle.

L'hypertension artérielle d'origine rénale apparaît au contraire comme la conséquence d'une sécrétion inappropriée de rénine : l'hypersécrétion de rénine est inappropriée aux conditions hémodynamiques car lors de la réalisation de sa sténose artérielle rénale, il n'existe ni hypovolémie, ni anomalie de répartition de la masse sanguine.

En faveur de cette conception plaident encore certains faits : chez une chienne gravide, la ligature des artères utérines augmente instantanément et transitoirement les résistances périphériques (188). L'interprétation que nous proposons est que

.../...

l'élévation de la pression artérielle est due à la suppression brutale des anomalies hémodynamiques de la gravidité.

La sécrétion de rénine devient ainsi instantanément et transitoirement inappropriée.

Inversement la grossesse (189) ou l'hypertension portale (190) peut améliorer une hypertension artérielle d'origine rénale. Le mécanisme de cette amélioration est certainement complexe ; dans notre hypothèse, la sécrétion de rénine inappropriée au cours de l'hypertension d'origine rénale devient appropriée aux nouvelles conditions hémodynamiques, d'où la diminution de la pression artérielle.

C O N C L U S I O N

Grâce aux résultats expérimentaux obtenus par la nouvelle méthode de BOUCHER* pour le micro-dosage de la rénine plasmatique chez le rat, une hypothèse sur la physiologie et la physiopathologie du système rénine-angiotensine peut être proposée. Elle ne constitue pas la description de fait prouvés, elle propose un mode de raisonnement actuellement pratique pour interprêter les données de la littérature.

Une meilleure compréhension de la physiologie de l'eau et du sodium et de l'hypertension artérielle dépendra, dans les années à venir, de nombreuses techniques et expériences nouvelles. Deux lignes de recherches nous semblent particulièrement prometteuses :

- l'étude analytique de chacun des nombreux facteurs du système rénine-angiotensine,
- le rôle du système nerveux central et autonome dans la régulation des hormones contrôlant le métabolisme hydro-minéral.

* BOUCHER R., MENARD J et GENEST J.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 1966, 45, 881.

REFERENCES

1 - KOHLSTAEDT K.C., MOSER M., FRANCIS T. Jr., NEEL J. and MOORE F., Circulation 1958, 17, 728

2 - DAHL L.K., J. Exp. Med., 1961, 114, 231

3 - MERRILL J.P., GIORDANO C. and HEETDERKS D.R. Amer. J. Med. 1961, 31, 931

4 - BLUMBERG A., NELP W.B., HEGSTROM R.M. and SCRIBNER B.H. Lancet. 1967, 11, 69

5 - FREIS E.D., Physiol. Rev. 1960, 40, 27

6 - SANNERSTEDT R., Acta Med. Scand. 1966, 180, suppl. 458

7 - LEE J.B., HICKLER R.B., SARAVIS C.A. and THORN G.W. Circulat. Res. 1963, 13, 359

8 - MILLIEZ P., MEYER P., LAGRUE G. and BOIVIN P. Path. et Biol. 1961, 9, 1887

9 - MUIRHEAD E.E., DANIELS E.G. and HIN MAN J.W. in 1ère Réunion du Club International sur l'hypertension artérielle, Paris, 1965, Expansion Scient. Ed.

10 - FINNERTY E.A., Circulation, 1962, 25, 255

11 - CANNON P.J., AMES R.P. and LARAGH J.H.
Amer. J. Physiol., 1966, 211, 1021

12 - BLAIR-WEST J.R., COGHLAN P.J., DENTON D.A., GODING J.R., MUNRO J.A., PETERSON R.T. and WINTOUR M.
J. Clin. Invest., 1962, 41, 1606

13 - GANONG W.F., MULROW P.J., BORYCZKA A.A. and CERA G.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962, 109, 381

14 - BIRON P., CHRETIEN M., KOIW E. and GENEST J.
Brit. Med. J., 1962, 2, 1569

15 - GROSS F., SCHAETCHELIN M.D., BRUNNER H. and PETERS G.
Canad. Med. Ass. J. 1964, 90, 258

16 - TOBIAN L., Circulation, 1962, 25, 189

17 - RONDELL P.A., MAC VAUGH R.B. and BOHR D.F.
Circulation, 1958, 17, 708

18 - SCHAECHTELIN G., REGOLI D. and GROSS F.
Amer. J. Physiol. 1963, 205, 303

19 - TOBIAN L., Physiol. Rev. 1960, 40, 280

20 - PAGE I.H. and BUMPUS F.M., Physiol. Rev. 1961, 41, 331

21 - DAVIS J.O., J. Amer. Med. Ass. 1964, 188, 1062

22 - PEART W.S., Pharmacol. Rev. 1965, 17, 143

23 - GROSS F., BRUNNER H. ans ZIEGLER M.
Recent progress in Hormonal Research, 1965, 21, 119

24 - GANONG W.F., BIGLIERI E.G. and MULROW P.J.
Recent Progr. Hormon. Res. 1966, 22, 381

25 - WARREN B. and DOLINSKY M.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 123, 911

26 - KEMP E. and RUBIN I., Jr. Acta Chim. Scand. 1964, 18, 2403

27 - PEART W.S., LLOYD A.M., THATCHER G.N., PAYNE N., STONE N. and LEVER A.F., Biochem. J., 1965, 96, 310

28 - SKEGGS L., International Congress on Hypertension, 1966, Cleveland (to be published)

29 - SKEGGS L.T., LENTZ K.E., HOCHSTRASSER H. and KAHN J.R.
Canad. Med. Ass. J., 1964, 90, 185

30 - SKEGGS L.T. Jr, KAHN J.R. ans SHUMWAY N.P., J. Exp. Med., 1956, 103, 295

31 - LENTZ K.E., SKEGGS L.T. Jr., WOODS K.R., KAHN J.R. and SHUMWAY N.P., J. Exp. Med. 1956, 104, 183

32 - ARAKAWA K. et AL. International Congress on Hypertension, October 1966, Cleveland (to be published)

33 - BIRON P., Rev. Can. Biol. 1967, 26, 43

34 - KHAIRALLAH P.A., BUMPUS F.M., PAGE I.H. and SMEBY R.R.
Science, 1963, 140, 672

35 - PICKENS P.T., BUMPUS F.M., LLOYD A.M., SMEBY R.R. and
PAGE I.H., Circulat. Res. 1965, 17, 438

36 - ISKOVITZ H.D. and MILLER L.D.
Circulation Res. 1966, 19, 507

37 - BUMPUS F.M., SMEBY R.R., PAGE I.H. and KHAIRALLAH P.A.
Can. Med. Ass. J., 1964, 90, 190

38 - METHOT A.L., MEYER P., BIRON P., LAGRUE G. and MILLIEZ P.
Rev. Fse. Et. Clin. Biol. 1964, 9, 529

39 - KHAIRALLAH P.A., PAGE I.H., BUMPUS F.M. and TURKER R.K.
Circulation Res. 1966, 19, 247

40 - PLENTL A.A. and PAGE I.H., J. Exptl. Med. 1943, 78, 367

41 - HAAS E. and GOLDBLATT H., Circulat. Res. 1967, 20, 45

42 - SMEBY R.R., SEN S. and BUMPUS F.M.
Circulat. Res. 1967, 20, II - 129

43 - GENEST J., DE CHAMPLAIN J., BOUCHER R., VEYRAT R. and KOIW E.
Path. Biol. 1965, 13, 1024

44 - KOHLSTAEDT K.G. and PAGE I.H.
J. Exp. Med. 1940, 72, 201

45 - TOBIAN L., TOMBOULIAN A. and JANECEK J.
J. Clin. Invest. 1959, 38, 605

46 - LOWE R.D.
Lancet 1964, 2, 183

47 - SWANN H.G.
Amer. J. Cardiol. 1961, 8, 899

48 - GOTTSCHALK C.W.
Circulat. Res. 1964, 14 et 15, 197, suppl. 1

49 - WARTER J., SCHWARTZ J., BLOCH R. et VELLY J.
Presse Méd. 1965, 73, 1951

50 - LEVY S.G., LIGHT R.A. et BLALOCK A.
Amer. J. Physiol. 1938, 122

51 - CORCORAN A.C. et PAGE I.H.
Amer. J. Physiol. 1941, 133, 249

52 - SKINNER S.L., Mc CUBBIN J.W. et PAGE I.H.
Circulat. Res. 1964, 15, 64

53 - SKINNER S.L., Mc CUBBIN J.W. et PAGE I.H.
Circulat. Res. 1964, 15, 522

54 - HESS R. et GROSS F.
Amer. J. Physiol. 1959, 197, 869

55 - HESS R. et REGOLI D.
Brit. J. exp. Path. 1964, 45, 666

56 - GUYTON A.C., LANSTON J.B. et NAVAR G.
Circulat. Res. 1964, 14 et 15, 187 suppl. 1

57 - VANDER A.J. et MILLER R.
Amer. J. Physiol. 1964, 207, 573

58 - WHITE F.N.
Circulation 1965, 32, 219 suppl. 2

59 - BROWN T.C., DAVIS J.O., BINNION P.F. et OLICHNEY M.J.
Physiologist, 1964, 7, 96

60 - FRASER M., JAMES V.H.T., BROWN J.J., ISAAC P., LEVER A.F. et ROBERTSON J.I.S.
Lancet 1965, 2, 989

61 - BARAJAS L.
Lab. Invest. 1964, 13, 916

62 - TAQUINI A.C., BLAQUIER P. et TAQUINI A.S. Jr.
Canad. med. Ass. J. 1964, 90, 210

63 - VANDER A.J.
Amer. J. Physiol. 1965, 209, 659

64 - WATHEN R.L., KINGSBURY W.S., STOUDER D.A. et ROSTORFER H.H.
Fed. Prod. 1964, 23, 437

65 - WATHEN R.L., KINGSBURY W.S., STOUDER D.A., SCHNEIDER E.G. et ROSTORFER H.H.
Amer. J. Physiol. 1965, 209, 1012

66 - CARPENTIER C.C.J., DAVIS J.O., HOLMAN J.E., AYERS C.R. et BAHN R.C.
J. clin. Invest. 1961, 40, 196

67 - GENEST J., DE CHAMPLAIN et al.
Proceedings of the Council for High Blood Pressure Research.
Cleveland, Nov. 13 and 14, 1964

68 - VANDER A.J.
Proceedings of the Council for High Blood Pressure Research.
Cleveland, Nov. 13 and 14, 1964
Amer. Heart. Ass. p. 126

69 - COHEN E.L., ROVNER D.R., CONN J.W. et BLOUGH W.M.
Clin. Res. 1964, 12, 362

70 - MEYER Ph., ALEXANDRE J.M. et MILLIEZ P.
J. Urol.Néphrol. 1965, 71, 1107

71 - HELMER O.M.
Canad. med. Ass. J. 1964, 90, 221

72 - Editorial
Lancet 1959, 2, 332

73 - CULBERTSON J.W., WILKINS R.W., INGELFINGER F.J. et BRADLEY S.E
J. clin. Invest. 1947, 26, 1178

74 - BOJESEN E.
Symposium on aldosterone 1963, Oxford, 1964, Blackwell, éd.

75 - SLATON P.E. et BIGLIERI E.G.
Amer. J. Med. 1965, 38, 324

76 - RILEY J.P.
J. Urol. (Baltimore), 1965, 93, 631

77 - BARBOUR B.H. Clin. Res. 1966, 14, 152

78 - MERRIL J.P. et SCHUPAK E.
Canad. med. Ass. J. 1964, 90, 328

79 - SCHMID H.E.
Circulat. Res. 1962, 11, 185

80 - BINNION P.F. et HACHTER J.D.
Circulat. Res. 1963, 12, 393

81 - KRASNEY J.A., PAUDLER F.T., SMITH D.C., DAVIS L.D. et YOUMANS W.B. Amer. J. Physiol. 1965, 209, 593

82 - JAMES T.N.
Amer. J. Physiol. 1965, 209, 571

83 - Mc GIFF J. et FASY T.M.
J. clin. Invest. 1965, 44, 1911

84 - BENELLI G., DELLA BELLA D. et GANDINI A.
Brit. J. Pharmacol. 1964, 22, 211

85 - FELDBERG N. et LEWIS G.P.
J. Physiol. (Lond.), 1964, 171, 98

86 - KHAIRALLAH P.A., PAGE J.H. and TURKER K.R.
Circulat. Res. 1966, 19, 538

87 - PETERS G.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1963, 112, 771

88 - LANGFORD H.G.
Canad. med. Ass. J. 1964, 90, 332

89 - HUGUES-JONES N.C., PICKERING G.W., SANDERSON L.H., SCARBOROUGH H. et VANDERBROUCKES J.
J. Physiol. (Lond.), 1949, 109, 288

90 - ROSENFELD S., KRAUS. R. et Mc CULLEN A.
Amer. J. Physiol. 1965, 209, 835

91 - BARER G.R.
J. Physiol. (Lond.), 1963, 169, 62

92 - SCHMID H.E. Jr.
Fed. Proc. 1964, 23, 306

93 - CHESLEY L.S., WYNN R.M. et SILVERMAN N.L.
Circulat. Res. 1963, 13, 232

94 - LARAGH J.H., CANNON J.P., BENTZEL C.J., SICINSKI A.M. et MELTZER J.I., J. clin. Invest. 1963, 42, 1179

95 - BIRON P., CHRETIEN M., KOIW E. et GENEST J.
Brit. med. J. 1962, 1, 1569

96 - BARRACLOUGH M.A., PERRIELLO V.A., MARSDEN C.O. and JONES J.F.
Experienta 1967, 23, 140

97 - BARRACLOUGH M.A., JONES N.F., C.D. MARSDEN and BRADFORT B.C.
Experienta 1967, 23, 553

98 - LARAGH J.H., CANNON J.P., AMES R.P., SICINSKI A.M. et MELTZER J.I. J. Clin. Invest. 1962, 41, 1375

99 - BARBOUR B.H., GILL J.C. Jr et BARTTER F.C.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1964, 116, 806

100 - LEYSSAC P.P., LASSEN U.V. et THAYSSEN J.H.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 1961, 48, 602

101 - LEYSSAC P.P.
Acta Physiol. Scand. 1963, 58, 236

102 - LEYSSAC P.P.
Acta Physiol. Scand. 64, 1965, 176

103 - LEYSSAC P.P.
Acta Physiol. Scand. 1964, 62, 436

104 - LEYSSAC P.P.
Acta Physiol. Scand. 1965, 64, 167

105 - LASSITER W.E., MYLLE M. et GOTTSCHALK C.W.
Amer. J. Physiol. 1964, 206, 669

106 - GIEBISCH G., KLOSE R.M. et WINDHAGER E.E.
Amer. J. Physiol. 1964, 206, 687

107 - GLABMAN S., AYNEDJAN H.S. et BANK N.
J. Clin. Invest. 1965, 44, 1410

108 - GERTZ K.H.
Proc. internat. Union Physiol. Sci. 29 th internat. Congr.
Leyden, 1962, 1 (1), 370

109 - VANDER A.J.
Amer. J. Physiol. 1963, 205, 133

110 - WILKINS J.W., GREENE J.A. et WELLER J.M.
Amer. J. Physiol. 1965, 209, 1034

111 - VILLAREAL H., NIETO DE PASCUAL J., ARCILA H., LOPEZ VINAS C. et SIERRA P.
Nephron 1964, 1, 338

112 - SMEBY R.S.
Angiotensin systems experimental and renal diseases, Londres, 1963, Churchill éd. p 29

113 - LEYSSAC P.P.
Acta Physiol. Scand. 1964, 62, 449

114 - POZZANO R., TAYLOR D.W., HEIDEN REICH O.P.A. et KESSLER R.H.
J. Pharmacol. exp. Ther. 1958, 123, 89

115 - THURAU K., J. SCHNERMANN, W. NAGEL, M. HORSTER and M. WAHL
Circulat. Res. 1967, 20, II 79.

116 - THURAU K.
Amer. J. Med. 1964, 36, 698

117 - EISNER G.M., SLOTKOFF L.M. et LILIENFIELD L.S.
C.R. IIème Congrès Internat. Néphrologie, 1963, Prague, 1 vol.
Amsterdam, Excerpta Medica, éd.

118 - KAPLAN N.M. et BARTTER F.C.
J. clin. Invest. 1962, 41, 715

119 - MULLER J.
Acta endocr. (Kbh), 1965, 48, 283

120 - CARPENTER L.C.J., DAVIS J.O. et AYERS C.R.
J.clin.Invest. 1961, 41, 2026

121 - SLATER J.D.H., BARBOUR B.H., HENDERSON H.H., CASPER A.G.T.
et BARTTER F.C.
Clin. Sci. 1965, 28, 219

122 - CADE R. et PERENICH T.
Amer. J. Physiol. 1965, 208, 1026

123 - MARIEB N.J. et MULROW P.J.
Endocrinology, 1965, 76, 657

124 - LEE T.C., BIGLIERI E.G., VAN BRUNT E.E. et GANONG W.F.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1965, 119, 315

125 - LARAGH J.H., ANGERS M., KELLY W.G. et LIEBERMAN S.
J. Amer. med. Ass. 1960, 174, 234

126 - DAVIES-JONES G.A.B. et COX J.R.
Clin. Sci. 1965, 28, 591

127 - AMES R.P., BORKOWSKI A.J., SICINSKI A.M., et LARAGH J.H.
J. clin. Invest. 1965, 44, 1171

128 - BROWN J.J., DAVIES D.L., LEVER A.F. et ROBERTSON J.I.S.
Canad. med. Ass. J. 1964, 90, 201

129 - VEYRAT R., CHAMPLAIN J. de, BOUCHER R. et GENEST J.
Canad. med. Ass. J. 1964, 90, 215

130 - FASCIOLO J.C., de VITO E., ROMERO J.C. et CUCCHI J.N.
Canad. med. Ass. J. 1964, 90, 206

131 - BROWN J.J., DAVIES D.L., LEVER A.F. et ROBERTSON J.I.S.
Lancet, 1963, 2, 278

132 - MULLER J.
Acta Endocr. (Kbh), 1965, 50, 301

133 - LARAGH J.H. et STOERK H.C.
J. clin. Invest. 1957, 36, 383

134 - LARAGH J.H., ULICK S., JANUSZEWICZ W., KELLY W.G. et LIEBERMAN S. , Ann. intern. Med. 1960, 53, 259

135 - DAVIS J.O., URQUHART J. et HIGGINS J.T.
J. clin. Invest. 1963, 42, 597

136 - MACH R.S.
Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker, Paris, 1964. Ed., Méd., Flammarion p. 69.

137 - BLAIR-WEST J.R., COGHLAN J.P., DENTON D.A., GODING R.J., WINTOUR M. et WRIGHT R.D.
Circulat. Res. 1965, 17, 386

138 - MULROW P.J., GANONG W.F., CERA G. et KULSIAW A.
J. clin. Invest. 1962, 41, 505

139 - MULROW P.J. et GANONG W.F.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1965, 118, 795

140 - BINNION P.F., DAVIS J.O., BROWN T.C. et OLICHNEY M.J.
Amer. J. Physiol. 1965, 208, 655

141 - HAAS H., GOLDBLATT H., GIPSON C. and LEWIS L.V.
Circulat. Res. 1966, 19, 739

142 - GRANGER P.
Thèse P.H. D. Mac Gill

143 - LITTLE J.B. and RADFORD Jr. E.P.
Bioassay for antidiuretic activity in blood of undistubed rats.
J. Appl. Physiol. 1964, 19, 179

144 - PITCOCK J.A., P.M. HARTROFT and L.N. NEWMARK
Increased renal pressor activity (renin) in sodium deficient rats and correlation with juxtaglomerular cell granulation.
Proc. soc. exp. Biol. (N.Y.) 1959, 100, 868

145 - TOBIAN L., J. JENECEK and A. TOMBOULIAN
Correlation between granulation of juxta-glomerular cells and extractable renin on rats with experimental hypertension.
Proc. soc. exp. Biol. (N.Y.) 1959, 100, 194

146 - FISHER E.R. and H.Z. KLEIN
Effect of sodium state on activity of renal juxtaglomerular cells and adrenal zona glomerulosa.
Proc. soc. exp. Biol. (N.Y.) 1966, 121, 142.

147 - ROJO-ORTEGA M.
The juxtaglomerular complex in various experimental.
States : light and microscopic studies.
Ph. D. THESIS, Mc GILL UNIVERSITY 1967

148 - BOURGOIGNIE J.J., F.J. CATANZARO and H.M. PERRY Jr.
Renin-Angiotensin-Aldosterone system during chronic thiazide therapy of benign hypertension.
Circulation, 1968, 37, 27

149 - ROSENTHAL J., ROJO-ORTEGA M., R. BOUCHER and J. GENEST
Effects of high temperature and actue diuresis on glucose 6 phosphate deshydrogenase (G6 PD) of macula densa and P.R.A of rats.
Clin. Res. 1968 (abstr).

150 - HARTROFT P.M. and W.S. HARTROFT
Studies on renal juxtaglomerular cells. Variations produced by sodium chloride and desoxycorticosterone acetate.
J. exp. Med. 1953, 97, 415

151 - M.A. KHOYI
Amer. Heart J. 1967, 73, 217

152 - J.K. Mac KENZIE, M.R. LEE and W.F. COOK
Circul. Res. 1966, 19, 269

153 - HODGE R.L., LOWE R.U. and VANE J.R.
J. Physiol. (London), 1966, 185, 613

154 - BROWN J.J., DAVIES D.L., LEVER A.F., J.I.S. ROBERTSON and A. VERNIORY.
J. Physiol. (London), 1966, 182, 649

155 - ZIEGLER M., and F. GROSS
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1964, 116, 774

156 - FRASER R., JAMES V.H.T., BROWN J.J., ISAAC, LEVER A.F. and J.I.S. ROBERTSON
Lancet, 1965, 2, 989

157 - MEYER P., J. MENARD, J.M. ALEXANDRE and B. WEIL
Rev. Can. Biol. 1966, 25, 111

158 - ROSENTHAL J., BOUCHER R., NOWACZYNSKI W. and J. GENEST
Can. J. Physiol. Pharmacol. 1968, 46, 85

159 - GORDON R.D., KUCHEL O., LIDDLE G.W. and ISLAND D.P.
J. Clin. Invest. 1967, 46, 599

160 - MOSES A.M.
Endocrinology, 1963, 73, 230

161 - WEINSTEIN H., BERNE R.M. and H. SACHS
Endocrinology, 1966, 66, 712

162 - SHARE L.
Endocrinology, 1961, 69, 925

163 - BROWN T.C., DAVIS J.O., OLICHNEY M.J. et JOHNSTON C.I.
Circulat. Res. 1966, 18,475

164 - MEYER P., ALEXANDRE J.M., DEVAUX C., LEROUX-ROBERT C. et P. MILLIEZ
Presse Méd., 1966, 74, 2025

165 - BROWN J.J., DAVIES D.L., LEVER A.F. et ROBERTSON J.I.S.
Brit. med. J., 1965, 2, 1215

166 - GROSS F.
Acquisitions médicales récentes, 1964, Expansion Scient. Franç., Paris, 1964.

167 - MEYER P., LORAIN. M.F., MILIN. J.Y., METHOT A.L., LAGRUE G. et MILLIEZ P.
Rev. Franç. Etud. Clin. Biol., 1964n 9, 862

168 - BING J.
Acta Path. Microbiol. Scand. 1962, 56, 362

169 - VERNIORY A. et POTVLIEGE P.
Club international sur l'hypertension artérielle. Première réunion 1965. Expansion Scient. Franç. Paris, 1965, P. Milliez,éd.

170 - HOLLANDER W., KRAMSCH D.M.,J.YAGI et MADOFF I.M.
Club internation sur l'hypertension artérielle. Première réunion 1965. Expansion Scient. Franç., Paris, 1965, P. Milliez éd.

171 - KUCHEL O., FISHMAN L.M., LIODLE G.W. et MICHELAKIS A.M.
Clin. Res. 1966, 14, 491 (abstr.).

172 - BUNAG R.D., PAGE I.H. et Mac CUBBIN J.W.
Cardiovasc. Res., 1967, 1, 67

173 - TOBIAN L., COFFEE K., FERREIRA D. et MELVI J.
J. clin. Invest., 1964, 43, 118

174 - TOBIAN L.
Fed. Proc., 1967, 26, 48

175 - LEDINGHAM J.M. et COHEN R.D.
Canad. med. Ass. J., 1964, 90, 242

176 - LAGRUE G., MEYER P., CHEVILLARD C., SAMARCQ P., HALPERN B.N. et MILLIEZ P.
Club international sur l'hypertension artérielle. Première réunion k965. Expansion Scient. Franç. Paris, 1965, P. Milliez, éd.

177 - FRIEDMAN S.M. et FRIEDMAN C.L.
Club international sur l'hypertension artérielle. Première réunion, 1965. Expansion Scient. Franç., Paris, 1965, P. Milliez, éd.

178 - GORDON R.D., WOLFE L.K., ISLAND D.P. et LIDDLE G.W.
J. Clin. Invest. 1966, 45, 1587

179 - ALBERT S.N.
"Blood volume", 1963, C.C. Thomas, éd., Springfield (III).